SPEZIFISCHE UMSETZUNGEN VON RIBOSOMENPROTEINEN UND tRNA MIT 1-FLUOR-2, 4-DINITROBENZOL

Dissertation
zur Erlangung des Doktorgrades
der Mathematisch-Naturwissenschaftlichen Fakultät
der Georg-August-Universität zu Göttingen

vorgelegt von
Friedrich Beesk
aus Angerstein

Göttingen 1976

Digitized by the Internet Archive
in 2026

https://archive.org/details/IA41534921_0026

SPEZIFISCHE UMSETZUNGEN VON RIBOSOMENPROTEINEN UND tRNA MIT 1-FLUOR-2, 4-DINITROBENZOL

Dissertation
zur Erlangung des Doktorgrades
der Mathematisch-Naturwissenschaftlichen Fakultät
der Georg-August-Universität zu Göttingen

vorgelegt von
Friedrich Beesk
aus Angerstein

Göttingen 1976

UNIV.
LEIDEN
BIBL.

D 7

Referent: Prof. Dr. H. Matthaei

Korreferent: Prof. Dr. G. Jakobi

Mündliche Prüfung: 1. Juli 1976

Bei meinem Lehrer Prof. Dr. H. Matthaei möchte ich mich für seine Anleitung zum wissenschaftlichen Arbeiten und die persönliche Förderung bedanken.

Die vorliegende Arbeit wurde von Januar 1974 bis Dezember 1975 am Max-Planck-Institut für experimentelle Medizin, Abteilung Molekulare Genetik, durchgeführt.

ABKÜRZUNGEN

A_{260}	Absorption oder Extinktion bei 260 nm
A_{260}-E.	Absorptions-Einheit: Substanzmenge, die in 1 ml Lösung bei einem Lichtweg von 1 cm eine Absorption von 1 ergibt
AA	Aminosäure
AA-tRNA	Aminoacyl-tRNA, "Aminosäure-beladene" tRNA
Ado oder A	Adenosin
AMP oder pA	Adenosin-5'-phosphat
ATP	Adenosin-5'-triphosphat
^{14}C	radioaktives Kohlenstoffisotop mit dem Atomgewicht ∿ 14
Ci	Curie = $2,22 \times 10^{12}$ Zpm
C	Cytidin
CMP oder pC	Cytidin-5'-phosphat
CTP	Cytidin-5'-triphosphat
DNP	Dinitrophenyl
EDTA	Äthylendiamintetraessigsäure
E.coli	Escherichia coli
FDNB	1-Fluor-2,4-dinitrobenzol
F_2DNB	1,5-Difluor-2,4-dinitrobenzol
G	Guanosin
Glu	Glutaminsäure
Gly	Glycin
h	Stunde(n)
^{3}H	Tritium, radioaktives Wasserstoffisotop mit dem Atomgewicht ∿ 3
Ipm	Zählimpulse pro Minute
L(1-34)	Proteine der 50S-Untereinheit aus Escherichia coli-Ribosomen
m	milli ($x10^{-3}$)
µ	mikro ($x10^{-6}$)
Lys	Lysin
mam^{5}s^{2}U	5-Methylaminomethyl-2-thiouridin
MET	2-Mercaptoäthanol
Met	Methionin
min	Minute(n)

mRNA	Messenger- oder Botenribonucleinsäure
p	pico ($x10^{-12}$)
Phe-tRNA	mit Phenylalanin beladene tRNA
Poly(Phe)	Polyphenylalanin
Poly(U)	Polyuridylsäure
rpm	Umdrehungen pro Minute
rRNA	Ribosomen-RNA
S	Sedimentationskonstante (Svedberg-Einheit, Maß für das Sedimentationsverhalten)
S(1-21)	Proteine der 30S-Untereinheit aus Escherichia coli-Ribosomen
Sephadex G	Poly-Dextran-Gel mit definierter Porengröße ("Molekularsieb")
Sephadex A	Poly-O-(Diäthylaminoäthyl)-Dextran (Anionenaustauscher)
spez. Akt.	spezifische Aktivität (Ci/Mol)
s^4U	4-Thiouridin
SVD	Phosphodiesterase aus Schlangengift (snake venom phosphodiesterase)
TEMED	N,N,N',N'-Tetramethyläthylendiamin
Tris	Tris(hydroxymethyl)aminomethan
Tyr	Tyrosin
tRNA	Transfer-RNA
$tRNA^{Phe}$ (E.coli B)	Phenylalanin-spezifische tRNA aus Escherichia coli-Stamm B
U	Uridin
UMP oder pU	Uridin-5'-phosphat
UV	ultraviolette Strahlung
Val	Valin
X	3-(3-Amino-3-carboxypropyl)Uridin
Zpm	Zerfälle pro Minute

INHALTSVERZEICHNIS

Seite

A ZUSAMMENFASSUNG 1

B EINLEITUNG 3

C MATERIAL UND METHODEN 9

1. Chemikalien 9

2. Messung von Radioaktivität 11

3. Messung von UV-Spektren und IR-Spektren 11

4. Präparation von AA-tRNA 12

5. Darstellung von Acetyl-Hydroxysuccinimid 13

6. Präparation von deacylierter tRNA 14

7. Präparation von N-Acetyl-Phe-tRNA 14

8. Präparation von im 3'-terminalen Adenosin markierter $tRNA^{Phe}$ 15

9. Präparation von ^{14}C-markierten E.coli-Ribosomen ... 16

10. Messung der nichtenzymatischen Bindung von Phe-tRNA an Ribosomen 17

11. Messung der Poly(U)-abhängigen Poly(Phe)-Synthese . 17

12. Messung der Poly(U)-Bindung an Ribosomen 18

13. Extraktion der Ribosomenproteine 18

14. Zweidimensionale Gelelektrophorese 19

15. Messung der Radioaktivität in den Gelen 21

D UMSETZUNGEN DER EINZELNEN PROTEINE IM RIBOSOM MIT ARYLHALOGENIDEN 22

1. Reaktion von FDNB mit Ribosomenproteinen von E.coli 22

a) Kinetik der Umsetzung mit Ribosomen 22

b) Umsetzung einzelner Proteine 25

c) Einfluß von Poly(U) auf das Ausmaß der Reaktion von FDNB mit ribosomalen Proteinen 27

Seite

d) Reaktion von FDNB mit E.coli-Proteinen unter Schutz durch Poly(U), $tRNA^{Phe}$ und N-Acetyl-Phe-tRNA 28

2. Reaktion von F_2DNB mit Ribosomen von E.coli ... 34

a) Kinetik der Umsetzung mit Ribosomen 34

b) Einfluß der Reaktion von Ribosomen mit F_2DNB auf ihre Poly(U)-abhängige Phe-tRNA-Bindung 37

c) Einfluß der Reaktion von Ribosomen mit F_2DNB auf ihre Poly(U)-Bindung und $tRNA^{Phe}$-Bindung 38

d) Schutzwirkung von Poly(U) und tRNA bei der Reaktion von Ribosomen mit F_2DNB 39

3. Differenzierte Markierung 40

a) Markierung von Ribosomen durch [^{3}H]FDNB nach vorheriger Reaktion mit F_2DNB 40

b) Markierung von Ribosomenproteinen durch [^{3}H]FDNB nach vorheriger Reaktion mit F_2DNB 42

E DISKUSSION DER UMSETZUNGEN VON RIBOSOMENPROTEINEN 50

F REAKTION VON FDNB MIT TRANSFERRIBONUCLEINSÄUREN ... 57

1. Einführung 57

2. Ergebnisse 59

a) Einfluß des pH-Wertes auf die Reaktionsgeschwindigkeit von $tRNA^{Phe}$ (Hefe) mit FDNB ... 59

b) Reaktion von FDNB mit tRNA(Hefe) und tRNA(E.coli) 60

c) Reaktion von spezifischen tRNA(E.coli) mit FDNB 62

d) Einfluß der Modifizierung mit FDNB auf die Akzeptoraktivität der tRNA 64

e) Analyse der mit FDNB modifizierten $tRNA^{Phe}$... 65

Seite

G DISKUSSION DER REAKTION VON tRNA MIT FDNB 73

H LITERATUR 75

A ZUSAMMENFASSUNG

Es wurde untersucht, ob sich spezifische Reaktionen von Ribosomenproteinen mit FDNB und F_2DNB durchführen lassen, welche für eine differenzierte Markierung bzw. Affinitätsmarkierung von ribosomalen mRNA- bzw. tRNA-Bindestellen in Betracht kommen. Ribosomale Proteine wurden im Ribosom mit [^{3}H]FDNB zur Reaktion gebracht, extrahiert und durch zweidimensionale Gelelektrophorese getrennt. Die quantitative Bestimmung der wiedergefundenen Ribosomenproteine wurde durch uniforme ^{14}C-Markierung der E.coli-Zellen ermöglicht. Nur wenige der 55 Proteine zeigten keine Reaktion mit Arylhalogeniden. In Gegenwart von Poly(U) oder Poly(U) und tRNA bzw. N-Acetyl-Phe-tRNA zeigten etliche Proteine sowohl der 50S- als auch der 30S-Untereinheit einen deutlich verminderten Umsatz mit dem Reagenz.

Eine differenzierte Markierung mit F_2DNB und FDNB wurde unter Bedingungen partieller Reaktion durchgeführt. Nach 4-stündiger Reaktion mit F_2DNB bei 12 ^{o}C zeigten sich in einer nachfolgenden 2,5-stündigen Reaktion mit [^{3}H]FDNB bei 25 ^{o}C für einige Proteine veränderte Reaktionsgeschwindigkeiten. Während das größte Protein, S1, aber auch S7 und L13 über das erste und zweite Reaktionsintervall eine gleiche Gesamtumsetzungsgeschwindigkeit seiner Gruppen aufwies, reagierten die Proteine S18, S21, L27 und L28 im ersten Intervall bedeutend schneller, wogegen eine dritte Gruppe der etwa 2/5 der Proteine angehören, im zweiten Intervall eine akzelerierte Geschwindigkeit aufwiesen. Durch Zu-

satz von Poly(U) und tRNA gelang es, eine (oder mehrere) Phe-tRNA-bindende Stelle(n) der Ribosomen vor Inaktivierung durch F_2DNB zu schützen. Nach Entfernung von Poly(U) und tRNA zeigten in der nachfolgenden Reaktion mit [^{3}H]FDNB mehrere Proteine einen veränderten Umsatz mit dem monofunktionellen Arylhalogenid.

Transferribonucleinsäuren konnten mit FDNB bei leicht alkalischem pH-Wert zur Reaktion gebracht werden. Hierbei reagierten spezifische tRNAs von E.coli in einem unterschiedlichen Ausmaß. Relativ schnelle Reaktionen zeigten die $tRNA^{Phe}$ und besonders die $tRNA_2^{Glu}$ und eine $tRNA^{Lys}$. Die Aminosäureakzeptoraktivität war nach Modifikation bei der $tRNA_2^{Glu}$ stark herabgesetzt, bei der $tRNA^{Phe}$ unverändert und bei der $tRNA^{Lys}$ geringfügig vermindert. Mit [^{3}H]FDNB umgesetzte $tRNA^{Phe}$ wurde nach Spaltung in Oligonucleotide und Nucleoside analysiert; es ergab sich ein Reaktionsort im Extra-Arm der $tRNA^{Phe}$, und zwar in dem Oligonucleotid GUUCCXm^7GU. Vermutlich ist die reagierende Nucleobase mit der abnormen Base 3-(3-Amino-3-carboxypropyl)Uridin identisch.

B EINLEITUNG

Die Proteinbiosynthese ist bei Bakterien in den Grundzügen aufgeklärt und in mehreren Übersichtsartikeln beschrieben (1-6). Sie findet an Ribosomen statt. Dieses sind Nucleoproteinkomplexe, die in Prokaryonten (Bakterien und Blaugrünalgen) einen Sedimentationswert von 70S haben, während die Ribosomen im Cytoplasma von Eukaryonten einen Wert von 80S besitzen. Ribosomen von Chloroplasten und Mitochondrien haben ähnliche Größe wie die von Prokaryonten. Alle Ribosomen bestehen aus zwei verschieden großen Untereinheiten: die 70S-Teilchen aus 30S- und 50S- und die 80S-Ribosomen aus 40S- und 60S-Untereinheiten. Die biologische Synthese der Proteine ist ein komplexer Vorgang, an dem neben den Ribosomen noch mRNA, 50 verschiedene tRNAs, 20 Aminoacyl-tRNA-Synthetasen und Enzyme für Initiation, Elongation und Termination teilnehmen.

Am meisten ist über die Struktur und Funktion der Escherichia coli-Ribosomen bekannt. Die 70S-Teilchen haben ein Molekulargewicht von $\sim 2{,}7 \times 10^6$ Dalton und annähernd ellipsoide Form. Bei Mg^{2+}-Konzentrationen unter 1 mM dissoziieren sie in die zwei stabilen nicht identischen Untereinheiten. Die 30S-Untereinheit (MG $\sim 0{,}9 \times 10^6$ Dalton) ist sehr unsymmetrisch (55 Å x 220 Å x 220 Å) und enthält eine 16S-RNA mit ungefähr 1600 Nucleotiden (MG $\sim 0{,}6 \times 10^6$ Dalton) und 21 verschiedene Proteine. Die mehr symmetrische 50S-Untereinheit (130 Å x 170 Å x 260 Å) hat ein Molekulargewicht von etwa $1{,}8 \times 10^6$ Dalton und besteht aus einer 23S-RNA

(MG ~ 1,2 x 10^6 Dalton), einer 5S-RNA (MG ~ 4 x 10^4 Dalton) und aus 34 verschiedenen Proteinen.

Die Basensequenz der 5S-RNA ist vollkommen bekannt (7). Die 16S-RNA ist zu 90 % sequenziert (8, 9), während dies bei der 23S-RNA nur in einigen wenigen Bereichen der Fall ist (10). Basenpaarung kommt bei 70 % der Nucleotide vor.

Ungefähr ein Drittel des Gesamtgewichtes der Ribosomen besteht aus Proteinen. Beide ribosomalen Untereinheiten sind bezüglich ihrer Proteinpopulation heterogen, d. h. nicht alle Proteine kommen in jedem Ribosom stöchiometrisch vor (11). Man unterteilt die Proteine der 30S-Untereinheit in drei Gruppen.
1. Unit-Proteine (0,8 - 1,2 Kopien je Untereinheit)
2. Marginal-Proteine (0,5 - 0,8 Kopien je Untereinheit)
3. Fractional-Proteine (weniger als 0,5 Kopien je Untereinheit).
Neben diesen drei Gruppen von Proteinen enthält die 50S-Untereinheit noch eine vierte Gruppe von Proteinen, die sogenannten "fractional repeats" Proteine, die in etwa 1,2 - 1,8 oder noch mehr Kopien je Untereinheit vorkommen. Der Grund für die Heterogenität in der Proteinzusammensetzung mag daher rühren, daß "Fractional"-Proteine nicht bei allen Schritten der Proteinbiosynthese an das Ribosom gebunden sind.

Das Molekulargewicht der Proteine liegt zwischen 7000-32000 (12). Eine Ausnahme macht hierbei das Protein S1, das ein Molekulargewicht von 65 000 besitzt. Sehr viele dieser Proteine haben einen hohen basischen Aminosäureanteil (13). Fast alle

Proteine besitzen daher einen hohen isoelektrischen Punkt von pH 10 oder noch höher, und nur drei sind schwach sauer mit einem isolelektrischen Punkt von ∿ pH 5 (S6, L7, L12). Durch Untersuchungen mit Antikörpern (14, 15) und durch Sequenzanalyse der Aminosäuren konnte festgestellt werden, daß nur 2 Proteine (S20 und L26) die gleiche Primärstruktur haben. Sechs Proteine (S4, S7, S8, S15, S17, S20) binden spezifisch an die 16S-RNA (16-18), drei Proteine (L5, L18, L25) an die 5S-RNA (19-22) und elf Proteine (L1, L2, L3, L4, L6, L13, L16, L17, L20, L23, L24) an die 23S-RNA (23-25). Durch Rekonstitutionsversuche (26) und Reaktion mit bifunktionellen Reagenzien (27-32) gelang es, die räumliche Anordnung der Proteine untereinander näher festzulegen. Chemische Modifikation mit monofunktionellen Reagenzien (33-61) zeigte, daß kein Protein so verborgen ist, daß Reaktion überhaupt nicht möglich ist. Fünf Proteine der 30S-Untereinheit (S9, S11, S12, S14, S20) und 9 Proteine der großen Untereinheit (L1, L6, L14, L15, L19, L20, L23, L26, L27) scheinen zu der Berührungsstelle ("interface") zwischen den Untereinheiten zu gehören, da nach Reaktion von Antikörpern mit diesen Proteinen keine Reassoziierung mehr möglich war. Mit physikalischen Methoden (z. B. Fluoreszenzspektroskopie) versucht man ebenfallls die Struktur des Ribosoms aufzulösen und die Bindungsstellen der Proteine an der RNA festzulegen (49, 50, 59-61), denn das Zusammenspiel dieser ribosomalen Komponenten muß mitentscheidend dafür sein, daß für die matrizenabhängige Bindung von AA-tRNA an Ribosomen nur mRNA, AA-tRNA, Ribosomen und ein geeignetes Ionenmilieu nötig sind (62-65).

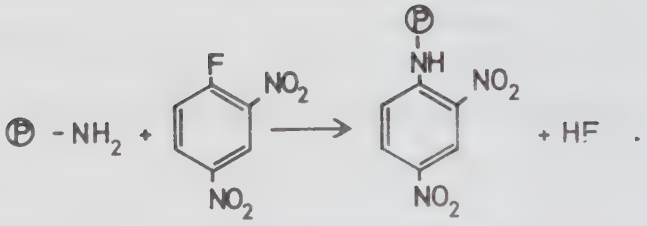
Verglichen mit dem Ribosom ist die tRNA ein einfaches Makromolekül (MG ~ 2,5 x 10^4 Dalton). Sie besteht aus 75-95 Nucleotiden, wobei neben den normalen Nucleosiden Uridin, Cytidin, Adenosin und Guanosin noch eine größere Anzahl an seltenen Nucleosiden auftritt. Diese stehen oft an definierten Stellen in verschiedenen tRNA-Spezies. So besitzen z. B. fast alle tRNAs von E.coli ein 4-Thiouridin in der 8. Position. Die Nucleotidketten lassen sich in ihrer Sekundärstruktur zu einer kleeblattähnlichen Struktur anordnen. Nach Röntgenstrukturanalysen (66, 114) falten sich diese Arme zu einer L-förmigen Tertiärstruktur.
Die AA-tRNA wird nun vermutlich unter anderem über eine Matrize, die mRNA, an das Ribosom gebunden. Diese besteht aus einem Polynucleotid mit den Nucleosiden Adenosin, Uridin, Cytidin und Guanosin, wobei jeweils drei benachbarte Basen als ein Codon gelesen werden.

Die Bindestellen der tRNA und mRNA versucht man durch Affinitätsmarkierung am Ribosom festzulegen. Hierbei werden Antibiotika (67-70), mRNA (71-77) oder Aminoacyl-tRNA (78-87) so chemisch modifiziert, daß immer noch ihre biologische Aktivität erhalten bleibt, sie aber nach komplexer Bindung an das Ribosom in der Lage sind, an rRNA oder Ribosomenproteinen kovalent zu binden. Nach Zerstörung der Ribosomen wird das in den meisten Fällen radioaktiv markierte Produkt isoliert und identifiziert. Eine größere Anzahl von Proteinen wurde dabei markiert. Ein Nachteil ist dabei die fast immer geringe Ausbeute. Bei Photoaffinitätsmarkierung mit Diazomalonyl-Phe-tRNA wurde mit erheblichem

Umsetzungsgrad 23S-RNA markiert (84), während Val-tRNA kovalent an die 16S-RNA gebunden wurde (86). Auch weitere Ergebnisse weisen darauf hin, daß nicht nur Proteine, sondern auch ribosomale RNA bei der Ausbildung von aktiven Zentren eine Rolle spielen mögen (69, 82, 88-90, 107).

Ribosomen sind in ihrer Funktionsweise nicht als statische Gebilde, sondern als dynamische Strukturen anzusehen. Während der verschiedenen Schritte der Proteinbiosynthese unterliegt das Ribosom Konformationsänderungen (91). Auch die Assoziierung von Untereinheiten bewirkt schon eine Veränderung der Konformation (45, 92).
Um die Funktion von Ribosomen zu verstehen, ist es also wichtig, diese verschiedenen ribosomalen Strukturen zu identifizieren und zu charakterisieren. Es wurde daher versucht, durch chemische Reaktion von Ribosomen mit 1-Fluor-2,4-dinitrobenzol aktive Bindungszentren zu lokalisieren und (oder) Konformationsänderungen zu messen. Dieses Reagenz inhibiert die Poly(U)-abhängige Phe-tRNA-Bindung und die Poly(Phe)-Synthese, aber nicht die Bindung von Poly(U) an das Ribosom (39).

Arylhalogenide wie 1-Fluor-2,4-dinitrobenzol reagieren mit SH-, α-NH_2- und ε-NH_2-Gruppen von Proteinen nach folgendem Schema:



Reaktion mit Imidazol und phenolischen Gruppen ist ebenfalls möglich (93).

C MATERIAL UND METHODEN

1. Chemikalien

Acrylamid	Serva, Heidelberg
Amidoschwarz 10B	Merck, Darmstadt
ATP	Boehringer, Mannheim
CTP	Boehringer, Mannheim
2,5-Diphenyloxazol	Koch-Light Laboratories, England
1,5-Difluor-2,4-dinitrobenzol	Merck, Darmstadt
1-Fluor-2,4-dinitrobenzol	Merck, Darmstadt
Harnstoff	Baker, Holland
N-Hydroxysuccinimid	Merck, Darmstadt
2-Mercaptoäthanol	Fluka, Schweiz
N,N'-Methylenbisacrylamid	Biomol, Ilvesheim
N,N,N',N',-Tetramethyläthylendiamin	Serva, Heidelberg
Poly(U)	Boehringer, Mannheim
Ribonuclease T_1	Boehringer, Mannheim
SVD	Worthington, England
tRNA	Boehringer, Mannheim
Triäthanolamin	Merck, Darmstadt
Tris(hydroxymethyl)aminomethan	Baker, Holland
Tween 80	Serva, Heidelberg
Unisolve 1	Koch-Light Laboratories, England
[^{3}H]ATP (spez. Akt. = 19 000 Ci/Mol)	Amersham-Buchler, Braunschweig
[^{3}H]FFDNB (spez. Akt. = 200 Ci/Mol)	
[^{14}C]Glucose (spez. Akt. = 285 Ci/Mol)	
L-[^{3}H]Phe (spez. Akt. = 1 150 Ci/Mol)	
L-[^{14}C]Phe (spez. Akt. = 513 Ci/Mol)	
[^{3}H]Poly(U)	NEN Chemicals GmbH, Frankfurt

Hier nicht aufgeführte Radiochemikalien wurden von Amersham-Buchler, Braunschweig, bezogen.

Hier nicht aufgeführte Standard-Chemikalien wurden von Merck, Darmstadt, bezogen.

Weiteres käufliches Material

GF/A Filter	Whatman, England
Sephadex G25, G100	Pharmacia, Schweden
Sephadex A25	Pharmacia, Schweden
Dialyseschlauch	Serva, Heidelberg
Membranfilter	Sartorius, Göttingen
Al_2O_3 "Alcoa"	Serva, Heidelberg

tRNA-Synthetase aus Bäckerhefe wurde von F. von der Haar zur Verfügung gestellt, tRNA-Nucleotidyltransferase aus Bäckerhefe von M. Sprinzl.

2. Messung von Radioaktivität

Die Radioaktivität der Proben wurde auf Filterplättchen (Whatman GF/A oder Sartorius Membranfilter, 0,4 µm) gemessen. Nach dem Trocknen unter einer IR-Lampe wurden die Plättchen in 2 ml Toluol mit 0,4 % PPO (2,5-Diphenyloxazol) eingetaucht und in einem Tricarb-Flüssigkeits-Szintillationsspektrometer (Packard) gezählt. Der Maschinenblindwert betrug etwa 20 Ipm.

Die Zählausbeuten wurden mit radioaktiven Standard-Proben bestimmt und betrugen für ^{3}H etwa 10 % und für ^{14}C etwa 75 %.

Wässrige Proben wurden mit der 20-fachen Menge an Unisolve 1 versetzt, mehrere Stunden bei 4 °C stehengelassen und dann gezählt. Die Zählausbeute lag hierbei für ^{3}H bei 11,8 % und für ^{14}C bei 33 %. Aus den gezählten Ipm wurden die entsprechenden molaren Mengen nach der Formel berechnet:

$$pMol = \frac{Ipm \cdot 100}{\text{Zählausbeute} \left[\frac{Ipm \cdot 100}{Zpm}\right] \cdot 2{,}22 \left[\frac{Ipm}{pCi}\right] \cdot \text{spez.Akt.} \left[\frac{pCi}{pMol}\right]}$$

3. Messung von UV-Spektren und IR-Spektren

UV-Spektren wurden mit einem Cary-Spektralphotometer 16 registriert oder mit einem Shimadzu-UV-Spektralphotometer gemessen. Spektroskopische Messungen bei fest eingestellten Wellenlängen wurden mit einem Zeiss-Spektralphotometer PM Q II durchgeführt.

Infrarot-Spektren wurden mit einem Infracord-Spektralphotometer von Perkin-Elmer aufgenommen.

4. Präparation von AA-tRNA

Die enzymatische Synthese von Phe-tRNA(Hefe) erfolgte nach Matthaei et al. (102) mit Hilfe einer Phe-spezifischen Synthetase aus Bäckerhefe, die zu 60 % aufgereinigt war (94).

"Beladungs-Mix" für 1 ml Reaktionsgemisch

Volumen	Substanz	Konzentration der Stammlösung	Konzentration im Reaktionsgemisch
150 µl	Tris-HCl pH 7,4	1 M	150 mM
50 µl	KCl	1 M	50 mM
10 µl	$MgCl_2$	1 M	10 mM
20 µl	ATP-K	100 mM	2 mM
50 µl	CTP-K	20 mM	1 mM
100 µl	PEP	80 mM	8 mM
2 µl	Pyruvat-Kinase	10 mg/ml	20 µg/ml
0,5 µl	$SH \cdot CH_2 \cdot CH_2OH$		7 mM
17,5 µl	H_2O		
400 µl	"Beladungs-Mix"		

Präparativer Ansatz

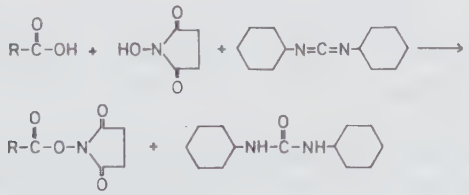
Volumen	Substanz	Konzentration der Stammlösung
400 µl	"Beladungs-Mix"	
100 µl	tRNA	10 mg/ml 200 A_{260}-E./ml
200 µl	[^{3}H]Phe	0,5 µMol/ml spez.Akt. = 1150 Ci/Mol
20 µl	Synthetase	3,2 mg/ml spez.Akt. = 400 E./mg
280 µl	H_2O	
1000 µl	Reaktionsgemisch	

Vor dem präparativen Ansatz wurden in 100 µl-Ansätzen die optimale Enzymkonzentration und Inkubationszeit bestimmt. Für den präparativen Versuch wurden die 1,0 ml-Gemische 30 min bei 37 °C inkubiert.

Nach der Inkubation bei 37 °C wurde mit einem gleichen Volumen wassergesättigtem Phenol versetzt, 20 min bei 4 °C geschüttelt und zentrifugiert. Dieser Vorgang wurde dreimal wiederholt. Die AA-tRNA wurde nun mit 2 Volumina auf -20 °C vorgekühlten Äthanols bei -20 °C gefällt, durch Sedimentation in 10 min bei 10 000xg isoliert, in 10 mM KCl, 1 mM $MgCl_2$ gelöst und zur weiteren Reinigung mit 10 mM KCl, 1 mM $MgCl_2$ über Sephadex G25 chromatographiert. Die unretardierte Fraktion enthielt die AA-tRNA. Die Lösung wurde auf 2 mg AA-tRNA/ml eingestellt.

5. Darstellung von Acetyl-Hydroxysuccinimid

Die Reaktion wurde nach Anderson et al. (95) durchgeführt.



Zu einer Lösung von 2,87 g (0,025 Mol) Hydroxy-N-succinimid und 1,25 g (0,0125 Mol) Essigsäureanhydrid in 57 ml Dioxan wurden unter Kühlen 5,15 g (0,025 Mol) N,N-Dicyclohexylcarbodiimid gegeben. Nach Beendigung der Reaktion wurde der gebildete Dicyclohexylharnstoff abfiltriert und mit Dioxan gewaschen. Das Filtrat wurde im Vakuum eingeengt und aus Methylenchlorid/Petroläther umkristallisiert. Es wurden farblose Nadeln erhalten. Die Ausbeute betrug 3,5 g, 90 % der theoretisch möglichen Ausbeute.

Der Schmelzpunkt war 130 °C, was der Literaturangabe genau entsprach (96). IR (KBr): 1820, 1780, 1750, 1430, 1380, 1250, 1220, 1170, 1070, 1050, 1020, 990, 835, 812, 768 cm^{-1}.

6. Präparation von deacylierter tRNA

100-200 mg tRNA (E.coli) wurden in 1,8 M Tris-HCl pH 8,0, 10 mM $MgCl_2$ zu 5 mg/ml gelöst und 30 min bei 37 °C inkubiert. Das Reaktionsgemisch wurde über eine mit 10 mM KCl und 1 mM $MgCl_2$ äquilibrierte Säule aus Sephadex G25 gegeben (2 cm Ø x 25 cm). Die tRNA-Fraktionen wurden mit 2 Volumina auf -20 °C vorgekühlten Äthanols über Nacht bei -20 °C gefällt; die tRNA wurde in 10 min bei 10 000xg abzentrifugiert (Servall SS-34). Die Sedimente wurden im Vakuum getrocknet und in 10 mM KCl, 1 mM $MgCl_2$ gelöst.

7. Präparation von N-Acetyl-Phe-tRNA

Die Acetylierung von Phe-tRNA erfolgte nach Lapidot et al. (97). Zu Phe-tRNA, 5 mg/ml gelöst in 10 mM KCl, 1 mM $MgCl_2$, wurde die zehnfache Menge an Acetyl-N-Hydroxysuccinimid in DMSO gegeben. Die Konzentration von DMSO im Gesamtreaktionsvolumen soll etwa 60 % betragen. Als Puffer wurde 50 mM Kaliumacetat pH 6,5 benutzt. Das Reaktionsgemisch wurde 20 Stunden bei 5 °C und danach noch 3 Stunden bei 20 °C geschüttelt. Nach Beendigung der Reaktion wurde die N-Acetyl-Phe-tRNA mit 2 Volumina bei -20 °C vorgekühlten Äthanols gefällt und noch 20 min bei -20 °C belassen; darauf wurde sie abzentrifugiert (10 min bei 10 000xg) und in einer mit 10 mM KCl und 1 mM $MgCl_2$ äquilibrierten Säule aus Sephadex G25 gereinigt. Die N-Acetyl-Phe-tRNA-Fraktion wurde mit wie oben auf -20 °C vorgekühltem Äthanol gefällt, abzentrifugiert, im Vakuum getrocknet und in 10 mM KCl, 1 mM $MgCl_2$ gelöst. Das Ausmaß der Acetylierung schwankte zwischen 90 und 100 %, was durch Dünnschichtchromatographie von alkalischen Hydrolysaten festgestellt wurde. Hierzu wurden 0,2 nMol tRNA

in 10 µl mit 0,3 N KOH 40 min bei 37 °C erwärmt. Das Hydrolysat wurde auf eine Kieselgel-Dünnschichtplatte 20 cm x 20 cm (Merck) aufgetragen. Als Fließmittel wurde Butanol : HCOOH : H_2O = 85 : 10 : 15 Volumina benutzt. Es kam zur Auftrennung von Phe (R_fWert = 0,41) und N-Acetyl-Phe (R_fWert = 0,89). Nach der Chromatographie wurde die Platte unter einer IR-Lampe getrocknet; dann wurden 0,5 cm lange Streifen abgeschabt und zur Radioaktivitätsmessung gebracht.

8. Präparation von im 3'-terminalen Adenosin markierter $tRNA^{Phe}$

Radioaktive, im 3'-terminalen Adenosin [^{3}H]markierte $tRNA^{Phe}$ wurde nach Sprinzl et al. (98) hergestellt. 15 mg $tRNA^{Phe}$ (= 300 A_{260}-E.) wurden in 2,5 ml 10 mM Tris-HCl pH 7,6, 10 mM $MgSO_4$ gelöst und mit 10 µg SVD 90 min bei 20 °C inkubiert. Danach wurde die Lösung durch Zugabe von Na-Acetat pH 4,5 auf einen pH-Wert von 5,2 eingestellt, auf eine Sephadex A25-Säule (2 cm Ø x 2,5 cm) gegeben, die mit 20 mM Na-Acetat pH 5,2, 0,5 M naCl äquilibriert war. Die abgespaltenen Nucleotide wurden mit 0,5 M NaCl eluiert. Darauf wurde die $tRNA^{Phe}_{-CA}$ mit 1 M NaCl herausgewaschen, mit zwei Volumina kaltem Äthanol versetzt, über Nacht bei -20 °C stehengelassen, abzentrifugiert und gefriergetrocknet. Die Ausbeute betrug 200 A_{260}-E.

Diese wurden in 3 ml 100 mM Tris-HCl pH 8,0, 0,01 M Mg^{2+}, 0,1 M KCl gelöst, mit 3 µMol [^{3}H] ATP und 4,5 µMol CTP versetzt und mit 30 µl tRNA-Nucleotidyltransferase aus Bäckerhefe (spez. Akt. = 9 000 Einheiten/mg) 20 min bei 31 °C inkubiert. Nach weiterer Zugabe von 10 µl tRNA-Nucleotidyltransferase wurde noch einmal 10 min bei 31 °C inkubiert, um eine vollständige Reaktion zu erreichen. Durch Zugabe von 250 µl Na-Acetat pH 4,5 wurde die Reaktion unterbrochen; die Lösung wurde auf eine Sephadex A25-Säule (2 cm Ø 3 cm) gegeben, die mit 20 mM Na-Acetat pH 5,2, 0,5 M NaCl äquilibriert war. Die Nucleotide wurden mit 0,5 M NaCl herausgewaschen, die nun radioaktiv markierte $tRNA^{Phe}$ danach mit 1 M NaCl eluiert. Diese wurde mit zwei Volumina kaltem Äthanol

über Nacht bei -20 °C gefällt, abzentrifugiert, gegen H_2O dialysiert, gefriergetrocknet und in 1 mM $MgCl_2$, 10 mM KCl gelöst. Die Ausbeute betrug 113 A_{260}-E. spez. Akt. 49 Ci/Mol.

9. Präparation von ^{14}C-markierten E.coli-Ribosomen

Radioaktiv markierte E.coli-Ribosomen wurden in einem Minimalmedium gezüchtet. Auf 100 l H_2O wurden folgende Substanzmengen eingewogen:

$K_2HPO_4 \cdot 3\ H_2O$	918 g
KH_2PO_4	300 g
NaCl	30 g
$MgSO_4 \cdot 7\ H_2O$	10 g
$(NH_4)_2SO_4$	100 g

Die Konzentration von mit ^{14}C-markierter Glucose (spez. Akt. = 4,14 mCi/Mol) betrug 5 mM. Der pH-Wert dieser Nährlösung war 7,0. Nach Animpfen von 100 l Medium mit 1000 A_{550}-E. E.coli-Bakterien (MRE 600) wurde bei limitierender Belüftung und logarithmischer Zellvermehrung 7 Stunden bei 37 °C bis zu einer A_{550} = 0,8 gezüchtet. Beendigung des Wachstums wurde durch Zugabe von Eis erzielt. Die Zellen wurden abzentrifugiert und zweimal mit Standardpuffer (10 mM Tris-HCl pH 7,8, 10 mM $MgCl_2$, 60 mM KCl) gewaschen. Die Ausbeute betrug 120 g Zellen aus 100 l Nährlösung.

70S-Ribosomen wurden nach Gros und Matthaei (99) isoliert. Die Zellen wurden mit Aluminiumoxid zerrieben, mit 7 mM MET-haltigem Standardpuffer eluiert; die Zelltrümmer wurden bei 13 000 rpm (20 000xg) sedimentiert. Nach Zugabe von DNase 2 µg/ml wurden die Ribosomen bei 134 000xg sedimentiert. Nach dreimaligem Waschen mit 0,5 M NH_4Cl betrug die Ausbeute 18 000 A_{260}-E.

Die Ribosomen wurden in Triäthanolamin-HCl pH 7,2 60 mM KCl, 15 mM $MgCl_2$ aufgelöst und in 200 µl-Aliquoten in flüssigem Stickstoff aufbewahrt.

10. Messung der nichtenzymatischen Bindung von Phe-tRNA an Ribosomen (Standard-Bindesystem)

Das Reaktionsgemisch enthielt in einem Volumen von 100 µl: 10 mM Tris-HCl pH 7,2, 60 mM KCl, 15 mM $MgCl_2$, 10 µg Poly(U), 50 µg tRNA, mit [^{3}H]Phe oder mit [^{14}C]Phe zu 2,3 % beladen, 2,4 A_{260}-E. = 50 pMol 5mal mit 0,5 M Ammoniumchlorid in Standardpuffer (10 mM Tris-HCl pH 7,8, 60 mM KCl, 10 mM $MgCl_2$) gewaschene Ribosomen. Inkubation erfolgte bei 37 °C für 20 min. Nach der Inkubation wurden die Proben mit ca. 5 ml eiskaltem Waschpuffer (10 mM Tris-HCl pH 7,2, 15 mM $MgCl_2$) durch Membranfilter (Porengröße 0,40 µm) gefiltert und mit 5 ml des gleichen Puffers nachgewaschen. Nach dem Trocknen unter einer Infrarotlampe wurden die Proben gezählt, um gebundene [^{3}H]Phe-tRNA zu bestimmen. Die ohne Zusatz von Poly(U) erhaltenen "Ribosomenblindwerte" wurden subtrahiert.

11. Messung der Poly(U)-abhängigen Polyphenylalanin-Synthese

Die Inkorporation von radioaktiv markiertem Phenylalanin in TCA-fällbare Peptide wurde nach beschriebenen Methoden gemessen (113). 100 µl Reaktionsgemische enthielten 80 mM NH_4Cl, 50 mM Tris-HCl pH 7,4, 7 mM $MgCl_2$, 7 mM MET, 0,4 mM GTP, 10 µg Poly(U), 30 µg $tRNA^{Phe}$, mit [^{3}H]Phe oder [^{14}C]Phe beladen und 5 µl gereinigtes S-100 (10 mg Protein/ml).

Nach 20 min Inkubation bei 37 °C wurden 75 µl auf Whatman GF/A-Filter plattiert; jedes Filter wurde in einen der 25 Schlitze eines Teflonkorbes gegeben, der in eiskalter 10%iger Trichloressigsäure stand. Im Korb eingeschlossen wurden die

Proben in folgender Reihenfolge gewaschen: Bei 90 °C 10 min in 5 % TCA, bei Raumtemperatur 2mal 1 min in 5 % TCA, 2mal 1 min in Äther/Äthanol (1:1 v/v), einmal 1 min in Äther. Die Filter wurden unter einem Warmluftföhn getrocknet.

12. Messung der Poly(U)-Bindung an Ribosomen

Um die Poly(U)-Bindung an E.coli-Ribosomen messen zu können, mußten Selectron Filter von Schleicher & Schüll vorbehandelt werden: Sie wurden 7 min 30 Sekunden in 0,5 N KOH bei 37 °C inkubiert. Danach wurden sie gut gewässert. Im nächsten Schritt wurden sie 30 min lang mit 0,1 M Tris-HCl pH 7,4 bei 37 °C behandelt. Abschließend wurden sie über Nacht bei 4 °C im Waschpuffer (25 mM Triäthanolamin-HCl pH 7,2, 15 mM $MgCl_2$) stehengelassen.

Die Messung der Poly(U)-Bindung wurde dann im Standard-Bindesystem durchgeführt. Nach der Inkubation wurden die Proben mit ca. 5 ml eiskaltem Waschpuffer durch die - wie oben beschrieben - vorbehandelten Membranfilter (Porengröße 0,4 µm) gefiltert und 5 mal mit 3 ml des gleichen Puffers nachgewaschen. Nach dem Trocknen unter einer Infrarotlampe wurden die Proben in einem Tricarb-Flüssigkeits-Szintillationsspektrometer gezählt, um gebundenes [^{3}H]Poly(U) zu bestimmen. Die ohne Zusatz von Ribosomen erhaltenen Blindwerte wurden subtrahiert.

13. Extraktion der Ribosomenproteine

Die Extraktion der Proteine aus E.coli-Ribosomen erfolgte nach Hardy et al. (100). Zu 96 A_{260}-E. = 6 mg Ribosomen in 200 µl Puffer (10 mM $MgCl_2$, 10 mM Tris-HCl pH 7,8, 60 mM KCl) wurden 20 µl 1 M $MgCl_2$ und 400 µl Essigsäure gegeben und 45 min bei 4 °C geschüttelt. Anschließend wurde 25 min bei 6000xg zentrifugiert und der Überstand mit den Proteinen abpipettiert. Der Niederschlag wurde noch einmal gewaschen. Die vereinigten Überstände wurden gefriergetrocknet.

14. Zweidimensionale Gelelektrophorese

Die Trennung der Proteine erfolgte nach dem System von Kaltschmidt und Wittmann (101) mit folgenden Gelkomponenten:

Trennung in der ersten Dimension

Trenn-Gel (pH 8,6)

54,0 g Harnstoff	4,8 g Borsäure
12,0 g Acrylamid	7,3 g Tris
0,3 g Bis-Acrylamid	0,45 ml TEMED
1,2 g EDTA-Na_2	mit H_2O in 148,5 ml Endvol. gelöst

Das Gel wurde mit 1,5 ml 7%iger Ammoniumperoxidisulfat-Lösung polymerisiert.

Proben-Gel

48,0 g Harnstoff	0,32 g Borsäure
4,0 g Acrylamid	0,06 ml TEMED
0,2 g Bis-Acrylamid	mit H_2O in 99,0 ml Endvol. gelöst

Zur Polymerisation wurden 0,5 mg Riboflavin und 5 mg Ammoniumperoxidisulfat in 1 ml H_2O zugesetzt.

Elektroden-Puffer (pH 8,6)

360,0 g Harnstoff	14,55 g Tris
2,4 g EDTA-Na_2	mit H_2O in 1 l Endvol. gelöst

Benötigt wurden pro Lauf 2 l.

Trennung in der zweiten Dimension

Trenn-Gel (pH 4,6)

360,0 g Harnstoff	53,3 ml Eisessig
180,0 g Acrylamid	9,6 ml 5 N KOH
5,0 g Bis-Acrylamid	5,8 ml TEMED
	mit H_2O in 967,0 ml Endvol. gelöst

Zur Polymerisation wurden 33 ml 10%iger Ammoniumperoxidisulfat-Lösung zugesetzt.

Start-Puffer für die Dialyse des Gels, in dem die erste Elektrophorese erfolgt ist

480,0 g Harnstoff	2,4 ml 5 N KOH
0,74 ml Eisessig	mit H_2O in 1,0 l Endvol. gelöst

Elektrodenpuffer

140 g Glycin
15 ml Eisessig
mit H_2O in 10 l Endvolumen gelöst

Die gefriergetrockneten Proteine (1-2 mg) wurden in 200 µl Proben-Gel gelöst, mit 2 µl einer Lösung von 0,5 mg Riboflavin und 5 mg Ammoniumperoxydisulfat in 1 ml versetzt und in der Mitte eines Gelröhrchens (0,6 cm Ø x 20 cm) durch UV-Bestrahlung (Osram-Leuchtstoffröhre) einpolymerisiert. Zur Kathode betrug die Trennstrecke 8 cm, zur Anode 11 cm.

Die Elektrophorese in der ersten Dimension erfolgte bei einer konstanten Spannung von 110 V in 22 h. Die Entnahme der Gele aus den Glasröhrchen erfolgte mit Hilfe von 50 % Glycerin. Um diese zu erleichtern, wurden die Röhrchen vor der Elektrophorese mit 1 % TWEEN 80 (Oleylsorbitanpolyäthylenglykoläther) benetzt, bei 50 °C getrocknet, vorsichtig mit destilliertem Wasser ausgespült und noch einmal bei 50 °C getrocknet. Die

erhaltenen Gele wurden mit 0,1 % Amidoschwarz 30 min angefärbt und dann mit 7 % Essigsäure entfärbt.

Sollte eine zweidimensionale Gelelektrophorese angeschlossen werden, so unterblieb die Färbung. Die herausgenommenen Gele wurden 1 Stunde gegen Startpuffer dialysiert. Für 30 Stunden wurde eine Spannung von 100 Volt an die Gelplatten gelegt. Nach Herausnahme der Platten wurden sie mit 0,5 % Amidoschwarz in 5 % Essigsäure 15 min angefärbt, 1 Stunde gewässert und danach etwa 40 Stunden mit 1 % Essigsäure entfärbt.

Da durch Luftblasen in den Gelen die Schärfe der Proteintrennung herabgesetzt wird, ist es notwendig, alle Acrylamidlösungen vor der Polymerisation im Vacuum zu entgasen.

15. Messung der Radioaktivität in den Gelen

Die Proteine wurden manuell mit einem Korkbohrer aus den Gelplatten herausgestochen, zur Auflösung in fest verschlossenen Zählröhrchen mit 500 µl 30 % H_2O_2 gegeben und über Nacht bei 50 °C inkubiert. Nach Zugabe von 10 ml Unisolve-Lösung wurde die Radioaktivität im Flüssigszintillationsspektrometer (Tricarb) gemessen.

D UMSETZUNGEN DER EINZELNEN PROTEINE IM RIBOSOM MIT ARYLHALOGENIDEN

1. Reaktion von FDNB mit Ribosomenproteinen von E.coli

a) Kinetik der Umsetzung mit Ribosomen

Das Ausmaß der Umsetzung wurde durch Messung der Radioaktivität der gekoppelten DNP-Gruppe verfolgt (Abb. 1). Man sieht eine geringfügig erhöhte Anfangsgeschwindigkeit, die in eine lineare Kinetik übergeht. Nach 5 h sind etwa 40 pMol DNP-Gruppen je pMol Ribosomen gebunden. Da das entstehende Produkt eine gelb-grüne Färbung besitzt, verändert sich auch das Absorptionsspektrum der Ribsomen im kurzwelligen sichtbaren Bereich und darunter (Abb. 2). Durch Messung der Absorptionsänderung bei 350 nm kann daher die Reaktion gut verfolgt werden. Man erhält einen weitgehend linearen Zusammenhang zwischen Absorptionszunahme bei 350 nm und Zunahme der kovalent gebundenen DNP-Gruppen am Ribosom (Abb. 3). Der hohe molare Extinktionskoeffizient von 11 600 ermöglicht es, auch kleine Mengen noch exakt zu bestimmen.

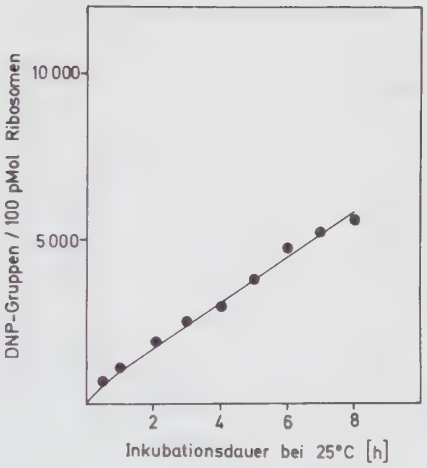


Abb. 1. Kinetik der Reaktion von [^{3}H]FDNB mit Ribosomen. Zu 96 A_{260}-E. Ribosomen, gelöst in 1 ml 25 mM Triäthanolamin-HCl pH 7,2 mit 60 mM KCl und 15 mM $MgCl_2$, wurden 25 µl einer 100 mM Lösung von [^{3}H]FDNB in Äthanol gegeben und bei 25 °C unter Schütteln zur Reaktion gebracht. Die Glasröhrchen waren dabei mit Aluminiumfolie bedeckt, um Zersetzung zu vermeiden. 50 µl-Aliquote wurden auf GF/A-Filter plattiert. Diese blieben 10 min in eiskalter 10%iger TCA. Danach wurden die Nucleinsäuren durch 10 min Erhitzen auf 90 °C in 5 % TCA zerstört und anschließend die Filterplättchen 2 x 1 min in 5 % TCA, 2 x 1 min in Äther/Äthanol (1:1 v/v) und 1 x 1 min in Äther gewaschen, getrocknet und zur Radioaktivitätszählung gebracht.

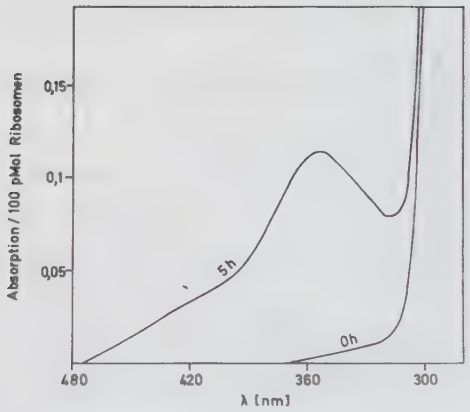


Abb. 2. Änderung des Absorptionsspektrums von Ribosomen durch Reaktion mit FDNB im langwelligen UV und im kurzwelligen sichtbaren Bereich. Reaktionsbedingungen wie unter Abb. 1 angegeben. Die Zunahme der Absorption wurde gegenüber einer Vergleichsküvette mit der gleichen Menge an FDNB im gleichen Puffer ohne Ribosomen gemessen.

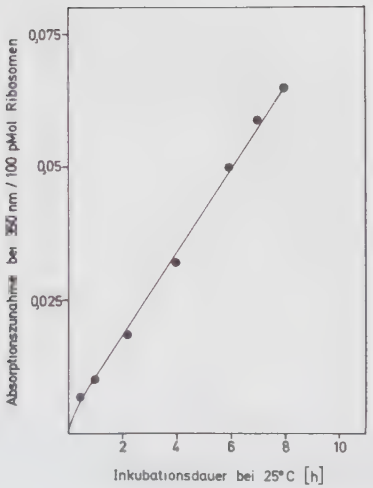


Abb. 3. Absorptionszunahme bei 350 nm bei Reaktion von Ribosomen mit FDNB in Abhängigkeit von kovalent gebundenen [^{3}H]DNP-Gruppen. Reaktionsbedingungen wie unter Abb. 1 angegeben. Die Änderung der Absorption wurde gegen eine Küvette, die nur Puffer und eine gleiche Menge an FDNB enthielt, gemessen.

b) Umsetzung einzelner Proteine

Die Reaktion der Proteine von 70S-E.coli-Ribosomen mit FDNB zeigt Abb. 4. Fast alle Proteine reagierten mit diesem Arylhalogenid. Einige Proteine (S1, S18, S21, L27, L28) zeigen besonders starken Umsatz mit diesem Reagenz, während bei den Proteinen L24, L29, L30, L31, L32 und L33 nur minimale Reaktion gemessen werden konnte. Bei S5 und S6 war keine sichere Aussage möglich, da kein Fleck sichtbar war. Abb. 5 zeigt die Proteintrennung nach der zweidimensionalen Gelelektrophorese.

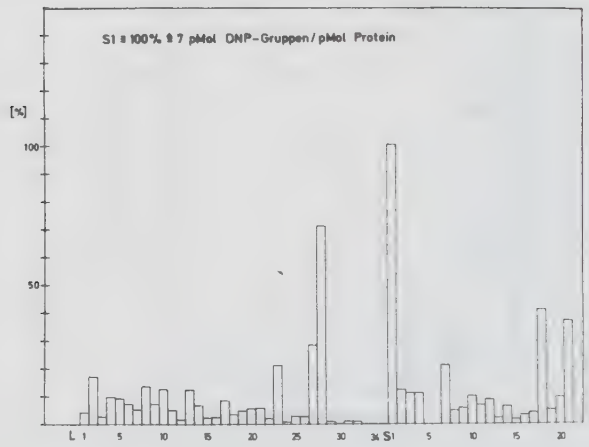


Abb. 4. FDNB-Reaktion der großen (L) und kleinen (S) Untereinheit der Ribosomen von E.coli (siehe auch Tabellen 1a und b). Nach 5 Stunden Reaktionszeit mit FDNB unter Standardbedingungen wurden die modifizierten Ribosomen von dem überflüssigen Reagenz durch Zentrifugation (3 Stunden 150 000xg) abgetrennt. Danach wurden wie in Material und Methoden beschrieben die Ribosomenproteine isoliert und einer zweidimensionalen Gelelektrophorese unterworfen. Die Radioaktivität der einzelnen Proteinflecken wurde wie unter Methoden beschrieben bestimmt. Die ^{14}C-Markierung diente neben den Molekulargewichten als Basis für die Berechnung der molaren Mengen der einzelnen Proteine; aufgrund der ^{3}H-Markierung wurden die molaren Mengen an gebundenen Dinitrophenyl-Gruppen kalkuliert. Die molare Umsetzung des Proteins S1 wurde = 100 % gesetzt. Diese betrug 7 pMol DNP-Gruppen je pMol S1-Protein.

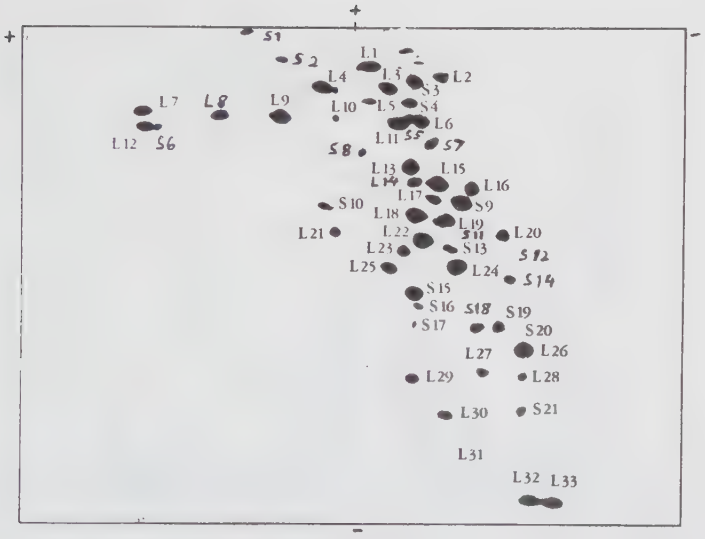


Abb. 5. Zweidimensionale Gelelektrophorese der Ribosomenproteine von E.coli. Die Trennung erfolgte wie unter Material und Methoden angegeben.

c) Einfluß von Poly(U) auf das Ausmaß der Reaktion von FDNB mit ribosomalen Proteinen

Die Wirkung einer vorangehenden Komplexbildung von Ribosomen mit Poly(U) auf die Kinetik der Reaktion mit FDNB zeigt Abb. 6. Im Komplex mit Ribosomen scheint Poly(U) eine größere Anzahl von reaktionsfähigen Proteingruppen vor dem Angriff durch FDNB zu schützen.

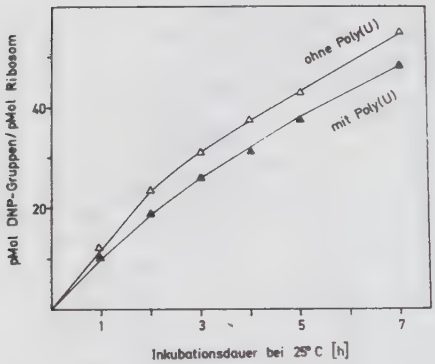


Abb. 6. Kinetik der Umsetzung von E.coli-Ribosomen mit FDNB, ohne und mit Schutz durch Poly(U). Ribosomen wurden mit oder ohne Poly(U) 20 min bei 37 ^{o}C inkubiert und dann mit [^{3}H]FDNB wie unter Abb. 1 beschrieben zur Reaktion gebracht.

d) Reaktion von FDNB mit E.coli-Proteinen unter Schutz durch Poly(U), $tRNA^{Phe}$ und N-Acetyl-Phe-tRNA

Wie aus den Tabellen 1a und b hervorgeht, vermindert vorangegangene Komplexbildung von Ribosomen mit Poly(U) bei vielen Proteinen das Ausmaß bzw. die Geschwindigkeit der Reaktion mit FDNB. So werden von den sehr stark mit FDNB reagierenden Proteinen S1, S21, L27 und L28 durch Komplexbildung geschützt, während S18 innerhalb der Meßgenauigkeit unverändert reagiert (Abb. 7). Über die Proteine, die nicht oder nur sehr langsam mit FDNB umgesetzt werden (L24, L29 - L34), konnte natürlich keine Aussage getroffen werden. Bei einigen Proteinen wichen die Meßwerte zu stark vom Mittelwert ab, wodurch der Wert einer Interpretation fraglich wäre.

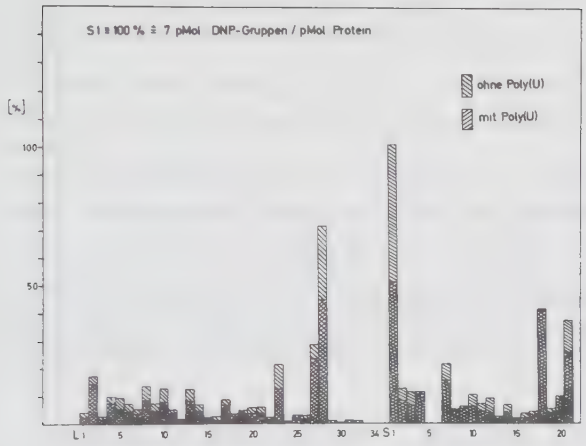


Abb. 7. FDNB-Reaktion der großen (L) und kleinen (S) Untereinheit der Ribosomen von E.coli mit oder ohne Poly(U) (siehe auch Tabellen 1a und b). Ribosomen wurden mit oder ohne Poly(U) 20 min bei 37 °C inkubiert und dann mit [^{3}H]FDNB wie unter Abb. 1 beschrieben zur Reaktion gebracht (5 h bei 25 °C). Danach wurden die modifizierten Ribosomen von dem überflüssigen Reagenz durch Zentrifugation (3 h bei 150 000 x g) abgetrennt und wie in Material und Methoden beschrieben die Ribosomenproteine isoliert und einer zweidimensionalen Gelelektrophorese unterworfen. Die Radioaktivität der einzelnen Proteinflecken wurde wie unter Methoden beschrieben bestimmt. Die molare Umsetzung des Proteins S1 mit [^{3}H]FDNB in Abwesenheit von Poly(U) wurde gleich 100 % gesetzt. Diese betrug 7pMol DNP-Gruppen je pMol S1-Protein.

Zusätzliche Anwesenheit von tRNA bzw. von N-Acetyl-Phe-tRNA bewirkte im allgemeinen keine gesicherten Unterschiede gegenüber dem Einfluß von Poly(U) allein; möglicherweise vermindern diese Zusätze die Reaktivität von L28, während solche Differenzen bei einigen anderen Proteinen nicht groß genug waren, um eine gesicherte Aussage zu gestatten. Die letzte Spalte dieser Tabellen zeigt die Ausbeuten der Proteine. Sie schwanken von Protein zu Protein stark. Dies zeigt, wie wichtig es war, in diesen Versuchen ^{14}C-markierte *E.coli*-Ribosomen einzusetzen.

Tabelle 1a und b (s. umseitig). Reaktion von Ribosomen in den einzelnen Proteinen mit [^{3}H]FDNB im ersten Intervall (5 h bei 25 ^{o}C) sowie Einfluß der Anwesenheit von Poly(U), Poly(U) und tRNA^{Phe}, Poly(U) und N-AcPhe-tRNA. Die Umsetzungen in der ersten Spalte sind bezogen auf die Umsetzung S1 = 100 % ≙ 7 pMol DNP-Gruppen je pMol S1-Protein. Die folgenden drei Spalten zeigen die prozentualen Unterschiede gegenüber den Umsetzungen in der ersten Spalte. In der letzten Spalte stehen die Ausbeuten an Protein nach der zweidimensionalen Gelelektrophorese, bezogen auf die zur Extraktion eingesetzten Ribosomen. Unterstrichene Ziffern zeigen Einflüsse, die im Rahmen der kleinen Anzahlen von Parallelbestimmungen (n = 4 bis 8) als gesichert erscheinen.

Tabelle 1a

Reaktion mit FDNB (S1 = 100) (n = 8)		Prozentuale Änderung der Umsetzung durch Poly(U) (n = 5)	Poly(U) + $tRNA^{Phe}$ (n = 5)	Poly(U) + N-AcPhe-tRNA (n = 4)	Ausbeute pMol Protein / pMol Ribosomen
S1	100 ± 15	-49 ± 8	-34 ± 9	-31 ± 1	0,048
S2	12,3 ± 2	-35 ± 3	-26 ± 7	-26 ± 7	0,13
S3	11 ± 0,85	-43 ± 8	-42 ± 7	-46 ± 3	0,39
S4	11 ± 0,75	-10 ± 8	-13 ± 4	-20 ± 3	0,45
S5[x]	-	-	-	-	-
S6[x]	-	-	-	-	-
S7	21 ± 1,5	-32 ± 6	-35 ± 7	-37 ± 6	0,2
S8	4,8 ± 0,3	-38 ± 13	-28 ± 10	-22 ± 11	0,073
S9	5,7 ± 0,6	-24 ± 15	-24 ± 3	-29 ± 6	0,74
S10	10 ± 4,8	-44 ± 6	-49 ± 5	-45 ± 10	0,20
S11	6,8 ± 0,8	-53 ± 13	-40 ± 4	3 ± 12	0,04
S12	8,7 ± 0,3	-67 ± 2	-74 ± 40	28 ± 55	0,025
S13	2,2 ± 0,6	-24 ± 7	-0,4 ± 18	11 ± 6	0,37
S14	6,3 ± 1	-27 ± 4	1 ± 10	9 ± 16	0,058
S15	1,7 ± 0,4	-21 ± 16	-31 ± 15	-21 ± 3	0,53
S16	3,2 ± 1	-49 ± 20	-12 ± 5	-60 ± 24	0,24
S17	4 ± 0,9	-34 ± 14	-32 ± 2	7 ± 22	0,047
S18	40,8 ± 3,5	-1 ± 8	-1 ± 8	20 ± 7	0,13
S19	5 ± 1	-21 ± 3	-14 ± 8	-5 ± 9	0,37
S20	9,5 ± 1,6	-16 ± 18	14 ± 13	-18 ± 16	0,12
S21	36,8 ± 5,7	-32 ± 5	-39 ± 9	-36 ± 3	0,05

x nicht auswertbar

Tabelle 1b

Reaktion mit FDNB (S1 = 100) (n = 8)		Prozentuale Änderung der Umsetzung durch Poly(U) (n = 5)	Poly(U) + $tRNA^{Phe}$ (n = 5)	Poly(U) + N-AcPhe-tRNA (n = 4)	Ausbeute pMol Protein / pMol Ribosomen
L1	4,2 ± 0,3	-30 ± 7	-31 ± 8	-33 ± 5	0,9
L2	17 ± 1,3	-18 ± 9	-24 ± 4	-22 ± 6	0,17
L3	2,7 ± 0,2	-16 ± 8	-16 ± 14	-25 ± 13	0,36
L4	9,7 ± 1,3	-24 ± 11	-16 ± 4	-12 ± 10	0,069
L5	9,2 ± 1,3	-33 ± 6	-29 ± 12	-27 ± 13	0,2
L6	7,2 ± 0,5	-25 ± 2	-16 ± 8	-21 ± 3	0,078
L7	5,2 ± 1,1	-31 ± 14	-48 ± 10	-27 ± 21	0,13
L8	13,5 ± 0,8	-33 ± 3	-17 ± 8	-20 ± 8	0,56
L9	7,2 ± 0,8	-31 ± 8	-44 ± 16	-4 ± 5	0,27
L10	12,5 ± 1,6	-32 ± 7	-24 ± 10	-19 ± 11	0,11
L11	5 ± 0,6	-27 ± 9	-6 ± 13	-20 ± 5	0,98
L12	1,6 ± 0,4	-36 ± 11	-40 ± 18	12 ± 25	0,32
L13	12,3 ± 2,6	-34 ± 5	-27 ± 4	-31 ± 4	0,31
L14	6,7 ± 1,1	-25 ± 4	-1 ± 11	-11 ± 23	0,031
L15	2,3 ± 0,6	-25 ± 7	-25 ± 8	-16 ± 10	1,08
L16	2,5 ± 0,34	-39 ± 6	-18 ± 11	29 ± 14	0,23
L17	8,5 ± 0,8	-18 ± 6	-20 ± 7	-10 ± 5	0,27
L18	3,5 ± 0,5	-27 ± 6	-26 ± 6	-29 ± 6	0,36
L19	4,7 ± 0,5	-25 ± 12	-30 ± 7	-15 ± 9	0,52
L20	5,5 ± 1,5	-37 ± 4	-38 ± 9	-30 ± 9	0,15

Tabelle 1b, Forts.

Reaktion mit FDNB (S1 = 100) (n = 8)	Prozentuale Änderung der Umsetzung durch Poly(U) (n = 5)	Poly(U) + $tRNA^{Phe}$ (n = 5)	Poly(U) + N-AcPhe-tRNA (n = 4)	Ausbeute pMol Protein / pMol Ribosomen
L21 5,7 ± 1,5	-39 ± 14	-33 ± 14	36 ± 28	0,031
L22 2 ± 0,45	-24 ± 17	-34 ± 14	-33 ± 17	0,61
L23 21 ± 2	-42 ± 13	-27 ± 11	-18 ± 4	0,3
L24 0,7 ± 0,3	-1 ± 3	-11 ± 11	6 ± 31	0,65
L25 2,8 ± 0,3	-32 ± 13	-34 ± 5	-35 ± 3	0,41
L26 2,7 ± 0,6	-32 ± 10	-25 ± 4	-36 ± 16	0,5
L27 28,3 ± 0,5	-21 ± 6	-4 ± 4	-14 ± 1	0,27
L28 71 ± 9	-39 ± 8	-46 ± 10	-46 ± 6	0,15
L29 0,9 ± 0,24	-30 ± 17	-34 ± 21	-9 ± 27	0,087
L30 0,3 ± 0,12	-43 ± 43	-	-	0,19
L31 1 ± 0	5 ± 76	-	-	0,068
L32 0,9 ± 0,5	9 ± 9	-	-	0,26
L33 0,1 ± 0,07	-9 ± 9	-	-	0,15
L34[X] -	-	-	-	-

X nicht auswertbar

2. Reaktion von F_2DNB mit Ribosomen von E.coli

a) Kinetik der Umsetzung mit Ribosomen

Da ein radioaktiv markiertes Produkt von F_2DNB nicht erwerblich war, konnte die Reaktion von Ribosomen mit diesem Arylhalogenid nur spektralphotometrisch verfolgt werden (Abb. 8-10). Mit der Annahme, daß das entstehende Produkt eine ähnliche molare Extinktion wie das des monofunktionellen Derivats hat, konnte die Anzahl der kovalent gebundenen Gruppen pro Ribosom näherungsweise berechnet werden. Einer Inkubationsdauer von 5 h bei 25 °C mit FDNB entspricht dann einer Reaktionsdauer von 30 min bei 25 °C oder 4 - 5 h bei 12 °C mit F_2DNB. Unter milderen Bedingungen wird also eine gleiche Anzahl von DNP-Gruppen gebunden. Um bifunktionelle Verknüpfungsprodukte zu vermeiden, wurde bei Benutzung von F_2DNB als Reagenz die längere Reaktionsdauer bei der niedrigeren Temperatur von 12 °C vorgezogen, da, im Überschuß eingesetzt, dieses dann nur noch monofunktionell reagiert (103). Aus Abbildung 10 wird erkennbar, warum es wenig sinnvoll erschien, Ribosomen quantitativ mit diesen Arylhalogeniden abreagieren zu lassen. Es können mehr als 150 pMol DNP-Gruppen pro pMol Ribosomen umgesetzt werden, und dieses würde die räumliche Struktur, vor allem aber die biologischen Aktivitäten in hohem Maße verändern und zerstören.

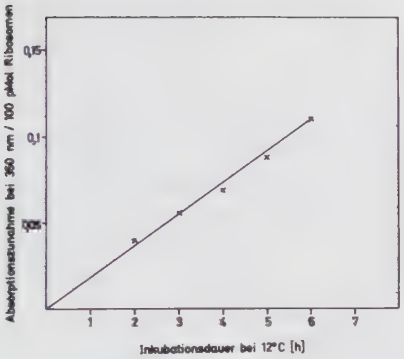


Abb. 8. Absorptionszunahme bei 350 nm bei der Reaktion von F_2DNB mit Ribosomen. Zu 16,5 A_{260}-E. Ribosomen, gelöst in 1 ml 25 mM Träthanolamin-HCl pH 7,2 mit 60 mM KCl und 15 mM $MgCl_2$ wurden 25 µl einer 100 mM Lösung von F_2DNB in Äthanol (frisch zubereitet) gegeben und bei 12 ^{o}C unter Schütteln zur Reaktion gebracht. Die Glasröhrchen wurden dabei mit Aluminiumfolie bedeckt, um Zersetzung durch Licht zu vermeiden. Die Zunahme der UV-Absorption bei 350 nm gegenüber einer Vergleichsküvette mit der gleichen Menge an F_2DNB im gleichen Puffer ohne Ribosomen wurde mit einem Zeiss-Spektralphotometer PMQ II bestimmt.

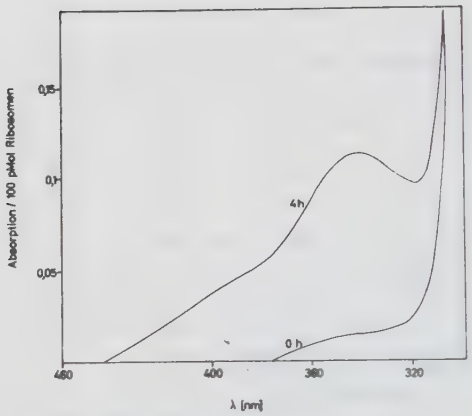


Abb. 9. Änderung des Absorptionsspektrums von E.coli-Ribosomen durch Reaktion mit F_2DNB im langwelligen UV und kurzwelligen sichtbaren Bereich (Reaktionsbedingungen wie unter Abb. 8 angegeben). Die Inkubationsdauer betrug 4 Stunden bei 12 °C.

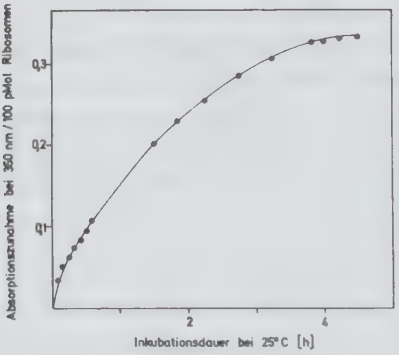


Abb. 10. Absorptionszunahme bei 350 nm durch Reaktion von F_2DNB mit Ribosomen bei einer Inkubationstemperatur von 25 °C. Reaktionsbedingungen sonst wie unter Abb. 8 beschrieben. Es wurde gegenüber einer Vergleichsküvette mit der gleichen Menge an F_2DNB im gleichen Puffer ohne Ribosomen gemessen.

b) Einfluß der Reaktion von Ribosomen mit F_2DNB auf ihre Poly(U)-abhängige Phe-tRNA-Bindung

Eine Inkubation der Ribosomen für 4 h bei 12 °C mit dem reaktiven Reagenz F_2DNB war ausreichend, um diese für Poly(U)-abhängige Phe-tRNA-Bindung weitgehend zu inaktivieren (Abb. 11).

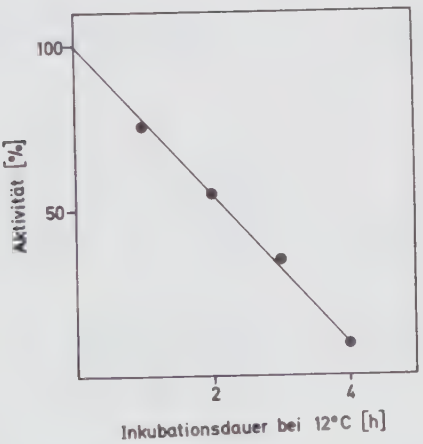


Abb. 11. Zeitabhängige Inaktivierung von Ribosomen durch Umsetzung mit F_2DNB, gemessen in der Poly(U)-abhängigen Phe-tRNA-Bindung. Bedingungen der Reaktion mit F_2DNB wie unter Abb. 8 beschrieben. Die Reaktion wurde mit überschüssigem MET gestoppt; die Ribosomen wurden in 4 h bei 42 000 rpm abzentrifugiert. Die Aktivität in der Phe-tRNA-Bindung wurde wie unter Material und Methoden beschrieben getestet.

c) Einfluß der Reaktion von Ribosomen mit F_2DNB auf ihre Poly(U)-Bindung und $tRNA^{Phe}$-Bindung

Inkubation von Ribosomen mit dem sehr reaktiven F_2DNB für 4 h bei 12 °C reicht nicht aus, um Poly(U) und (oder) $tRNA^{Phe}$ (Hefe) aus ihrem Komplex mit Ribosomen vollständig zu verdrängen (Abb. 12 u. 13). Ein leichter Rückgang von komplexgebundenem Material war zwar festzustellen, doch minimal zu nennen. Hierbei war der Komplex [Poly(U) · $tRNA^{Phe}$ · Ribosom] als sehr stabil gegenüber dem Einfluß von F_2DNB zu bezeichnen, während die komplexe Bindung von $tRNA^{Phe}$ (Hefe) oder Poly(U) allein etwas stärker zurückging.

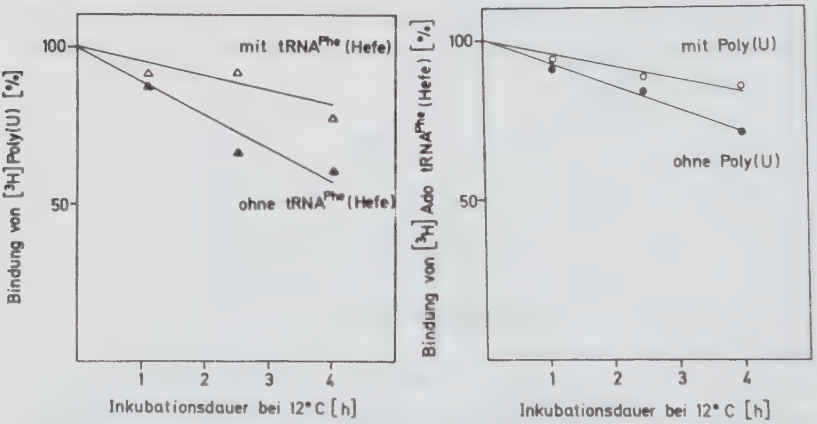


Abb. 12 und 13. Kinetik der Entfernung von [^{3}H]Poly(U) bzw. [^{3}H]Ado-$tRNA^{Phe}$ (Hefe) aus ihrem Komplex mit Ribosomen bei der Reaktion von Ribosomen mit F_2DNB. Ribosomen wurden 20 min bei 37 °C mit [^{3}H]Poly(U) und (oder) [^{3}H]Ado-$tRNA^{Phe}$ (Hefe) inkubiert und dann mit F_2DNB unter Standardbedingungen zur Reaktion gebracht. Das Ausmaß der komplexen Bindung wurde wie unter Material und Methoden beschrieben gemessen.

d) Schutzwirkung von Poly(U) und tRNA bei der Reaktion von Ribosomen mit F_2DNB

Vorangegangene komplexe Bindung von Poly(U) oder Poly(U) und tRNA schützt Ribosomen vor der Inaktivierung durch F_2DNB (Tabelle 2). Deacylierte tRNA allein scheint keinen Einfluß zu haben, während sie zusammen mit Poly(U) einen größeren Schutzeffekt zeigt als Poly(U) allein. Die Aktivität in der Poly(U)-abhängigen Poly(Phe)-Synthese wird durch Umsetzung mit F_2DNB auch schneller zum Erliegen gebracht als die in der Poly(U)-abhängigen Phe-tRNA-Bindung an Ribosomen. Dies war zu erwarten, da Proteinsynthese ein komplexerer Vorgang ist als codierte Bindung einer Aminoacyl-tRNA.

Tabelle 2. Schutz von E. coli-Ribosomen durch Poly(U) und $tRNA^{Phe}$ (Hefe) gegen Inaktivierung mit F_2DNB (Zahlen in % der Normalaktivität)

	Ohne Schutz	+ Poly(U)	+ $tRNA^{Phe}$	+ Poly(U) + $tRNA^{Phe}$
Poly(Phe)-Synthese	3 %	16 %	3 %	19 %
Phe-tRNA-Bindung	15 %	30 %	17 %	40 %

Ribosomen wurden 4 Stunden bei 12 °C mit 2 mM F_2DNB in 25 mM Triäthanolamin-HCl pH 7,2, 60 mM KCl und 15 mM $MgCl_2$ zur Reaktion gebracht. Die Reaktion wurde mit überschüssigem MET gestoppt; die Ribosomen wurden in 4 h bei 42 000 rpm abzentrifugiert. Zur Abtrennung von Poly(U) und $tRNA^{Phe}$ wurden sie danach durch 4,5 ml 5 - 20 % Saccharose mit 1 mM $MgCl_2$, 100 mM

KCl, 10 mM Tris-HCl pH 7,4 in einem SW 65-Rotor 40 h bei 40 000 rpm sedimentiert und in Standardpuffer aufgenommen. Ihre Aktivität wurde gemessen wie unter Material und Methoden angegeben.

3. Differenzierte Markierung

a) Markierung von Ribosomen durch [^{3}H]FDNB nach vorheriger Reaktion mit F_2DNB

Waren den Ribosomen vor der Reaktion mit F_2DNB Poly(U) und $tRNA^{Phe}$ zugesetzt worden, so zeigte sich eine etwas höhere Gesamtgeschwindigkeit der Umsetzung mit [^{3}H]FDNB im zweiten Reaktionsintervall (Abb. 14). Abbildung 15 resumiert die verschiedenen Schritte, die für diese Art der differenzierten Markierung notwendig waren, welche anschließend auf der Ebene der einzelnen Proteine untersucht wird.

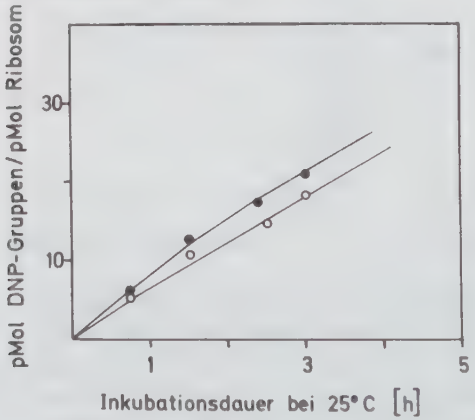


Abb. 14. Kinetik der Reaktion von Ribosomen mit [^{3}H]FDNB nach Umsetzung mit F_2DNB, und zwar •——• Reaktion nach vorheriger Komplexierung mit Poly(U) und $tRNA^{Phe}$, ○ ohne Vorbehandlung mit Poly(U) und $tRNA^{Phe}$. Ribosomen wurden wie bei Tabelle 2

beschrieben mit F_2DNB (5 h bei 12 °C) umgesetzt. Darauf wurden Poly(U) und $tRNA^{Phe}$ bei der Sedimentation durch einen 5 - 20%igen Saccharosegradienten in 1 mM $MgCl_2$, 100 mM KCl, 10 mM Tris-HCl pH 7,4 abgetrennt. Die Ribosomen wurden in Triäthanolamin-HCl pH 7,2, 15 mM $MgCl_2$, 60 mM KCl suspendiert und mit [^{3}H]FDNB bei 25 °C zur Reaktion gebracht. Im 1 ml-Gemisch befanden sich 35 A_{260}-E. Ribosomen und 2 µMol [^{3}H]FDNB spez. Akt. = 80 Ci/Mol. Aliquote wurden auf GF/A-Filter plattiert; diese wurden in eiskalte 10%ige TCA gegeben und 2 x 1 min in 5 % TCA, 2 x 1,5 min in Äther/Äthanol (1 : 1) und 1 x 1 min in Äther gewaschen und nach Trocknung zur Radioaktivitätsmessung gebracht.

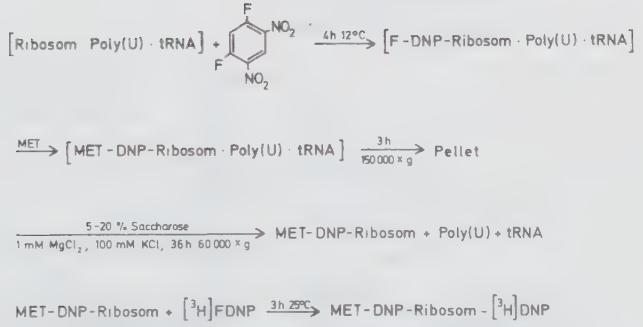


Abb. 15. Prinzip einer differenzierten Markierung von Ribosomen mit F_2DNB und [^{3}H]FDNB.

b) Markierung von Ribosomenproteinen durch [^{3}H]FDNB nach vorheriger Reaktion mit F_2DNB

Wie aus Abb. 16 ersichtlich, zeigen einige Proteine in dem zweiten Reaktionsintervall eine erheblich andere Umsetzungsgeschwindigkeit als in dem ersten Reaktionsintervall. Als Vergleichsprotein ist S1 geeignet, das weitaus größte und reaktivste Ribosomenprotein, welches in beiden Intervallen die gleiche Gesamtumsatzrate aufweist. Auffallend ist die starke Verminderung der Reaktion bei L23, L27, L28 sowie S18 und S21. Wie S1 reagiert auch S7 unverändert schnell weiter, während bei einer größeren Anzahl von L-Proteinen und S-Proteinen die Reaktionsgeschwindigkeit im zweiten Intervall akzeleriert ist.

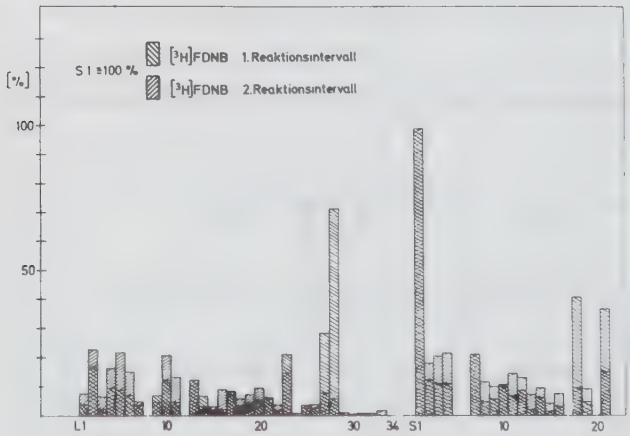


Abb. 16. Vergleich der Reaktion der einzelnen Ribosomenproteine mit [^{3}H]FDNB in dem 1. Reaktionsintervall von 5 h bei 25 °C und im 2. Reaktionsintervall von 2,5 h bei 25 °C nach einer vorherigen Reaktion gleichen Ausmaßes mit F_2DNB (siehe auch Tabelle 1 a und b und Tabelle 3 a und b). Die Markierung von S1 ≙ 100 % ≙ 7.0 pMol DNP-Gruppen je pMol S1-Protein nach dem ersten Reaktionsintervall und 3,5 pMol DNP-Gruppen je pMol S1-Protein nach dem zweiten Reaktionsintervall.

War vor der Reaktion mit F_2DNB Poly(U) zugesetzt worden, so zeigten nach Entfernung von Poly(U) einige Proteine bei der nachfolgenden Reaktion mit [^{3}H]FDNB eine erhöhte Umsetzung (Abb. 17, 2. Reaktionsintervall). Die Proteine L2, L4, L10, L11, L13, L17, L19, L20, L21, L23, L25, L26, L28 sowie S1, S2, S7, S9 und S14 können hier genannt werden. Die geringe Anzahl der Versuche im zweiten Reaktionsintervall (n = 3) bedingt bei vielen Proteinen einen sehr hohen mittleren quadratischen Fehler (Tabelle 3a und b), wozu schon die Abweichung einer der drei Messungen genügt. Weitere Proteine mögen daher eine erhöhte Umsetzung zeigen, doch erlauben die Streuungen hier keinen Schluß. Gesicherte Steigerungen der Reaktivität lassen sich für L4, L10, L11, L13, L20, L21, L25 und S2 feststellen. Ein Rückgang der zweiten Reaktion ergab sich bei L6 und besonders mit S12.

Waren vor der Reaktion mit F_2DNB Poly(U) und $tRNA^{Phe}$ (Hefe) zugesetzt worden, so zeigten wiederum einige Proteine nach Entfernung von Poly(U) und $tRNA^{Phe}$ (Hefe) bei der nachfolgenden Reaktion mit [^{3}H]FDNB eine erhöhte Umsetzung (Abb. 18, 2. Reaktionsintervall). Die Proteine L2, L20, L21, L27, L28, S1, S3, S7, S9, S14, S18 und S21 sind hier zu erwähnen. Tabelle 3a und b läßt erkennen, daß die Effekte bei L21, L28, S3, S14, S18 und S21 gesichert sind. Ein gewisser Rückgang der zweiten Reaktion ergab sich bei S12.

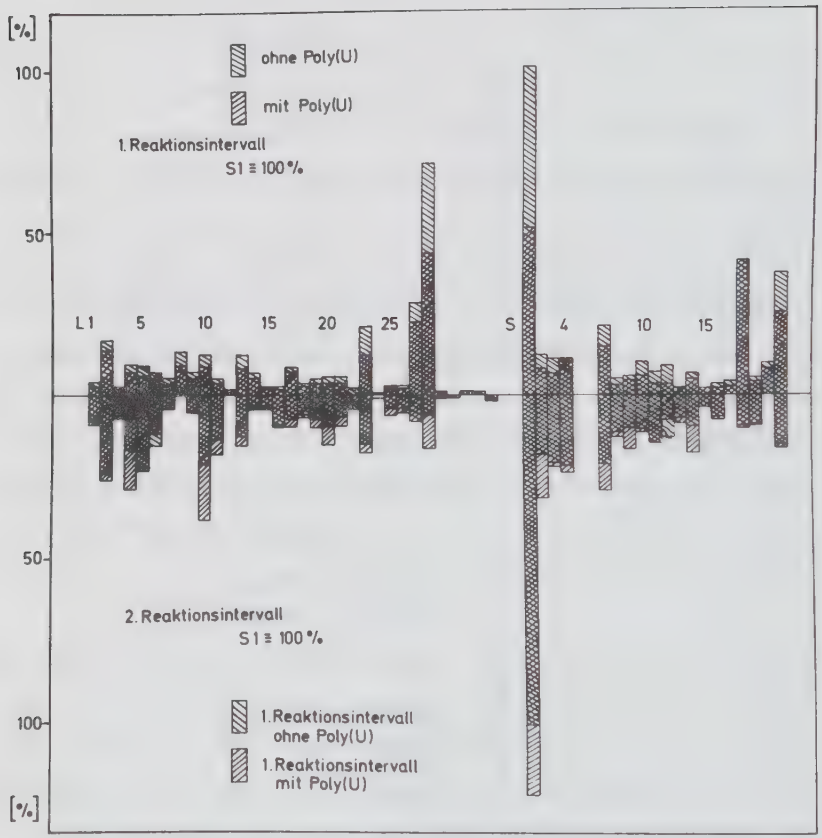


Abb. 17. Vergleich der ersten und zweiten Reaktion mit [^{3}H]FDNB von Ribosomen in den einzelnen Proteinen sowie Einfluß der Anwesenheit von Poly(U) im ersten Intervall (5 h bei 25 °C) auf die Reaktion mit [^{3}H]FDNB im zweiten Intervall (2,5 h bei 25 °C) (vgl. auch Tabelle 1 a und b und 3 a und b). Nach der Reaktion von Ribosomen mit F_2DNB (4 h bei 12 °C) wurde Poly(U) wieder entfernt (siehe Methoden). Die Markierung von S1 ≡ 100 % ≙ 7,0 pMol DNP-Gruppen je pMol S1-Protein nach dem ersten Reaktionsintervall bzw. 3,5 pMol DNP-Gruppen je pMol S1-Protein nach dem zweiten Reaktionsintervall.

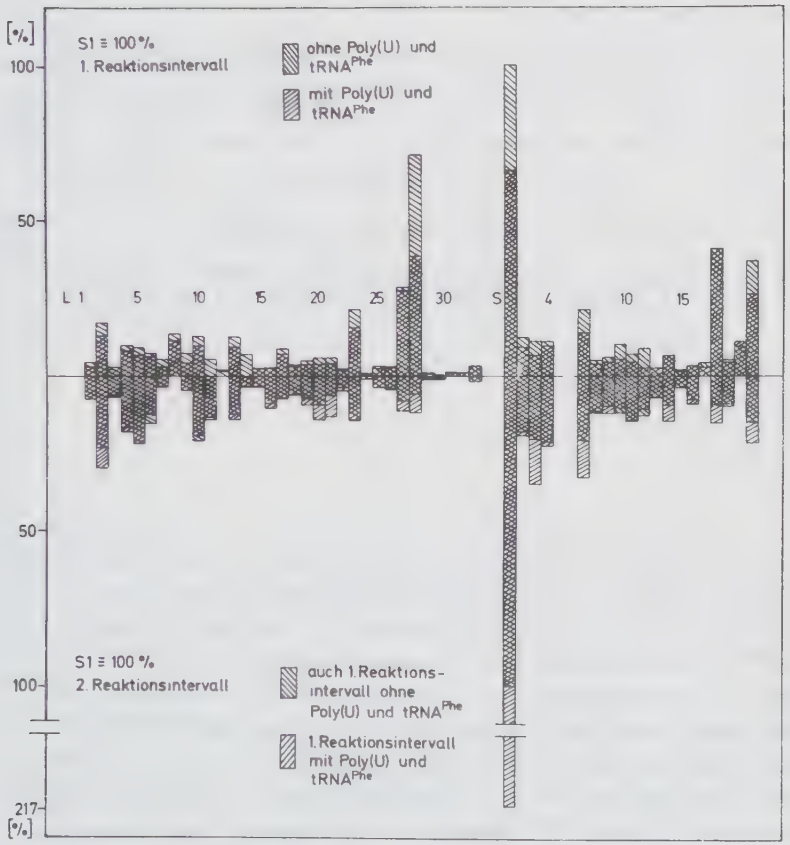


Abb. 18. Vergleich der ersten und zweiten Reaktion mit [^{3}H]FDNB sowie Einfluß der Anwesenheit von Poly(U) und $tRNA^{Phe}$ (Hefe) im ersten Intervall (5 h bei 25 °C) auf die Reaktion mit [^{3}H]FDNB im ersten und zweiten Intervall (2,5 h bei 25 °C) (vgl. auch Tabelle 1 a und b und 3 a und b). Nach der Reaktion von Ribosomen mit F_2DNB (4 h bei 12 °C) wurden Poly(U) und $tRNA^{Phe}$ (Hefe) wieder entfernt. Die Markierung von S1 ≡ 100 % ≙ 7,0 pMol DNP-Gruppen je pMol S1-Protein nach dem ersten Reaktionsintervall bzw. 3,5 pMol DNP-Gruppen je pMol S1-Protein nach dem zweiten Reaktionsintervall.

Vorbehandlung mit deacylierter $tRNA^{Phe}$ (Hefe) während der Reaktion von Ribosomen mit F_2DNB hatte im zweiten Reaktionsintervall mit [^{3}H]FDNB (2,5 h bei 25 ^{o}C) nur geringe Reaktionszunahme zur Folge. So wurden L20, L21, L28 sowie S2, S9, S11, S14 und S18 etwas stärker markiert. Verminderung der [^{3}H]FDNB-Umsetzung war oft festzustellen und trat besonders bei den Proteinen L3, L7, L11, L24, S16 und S19 hervor (vgl. Tabelle 3a und b).

Tabelle 3a und b (s. umseitig) Reaktion von Ribosomen in den einzelnen Proteinen mit [^{3}H]FDNB im zweiten Intervall (2,5 h bei 25 ^{o}C) sowie Einfluß der Anwesenheit von Poly(U) und/oder $tRNA^{Phe}$ (Hefe) während einer vorangegangenen Reaktion mit F_2DNB auf diese nachfolgende Reaktion mit [^{3}H]FDNB. Nach dem ersten Reaktionsintervall wurden Poly(U) und $tRNA^{Phe}$ (Hefe) wieder entfernt (vgl. Tabelle 2). Die Umsetzungen in der ersten Spalte sind bezogen auf die Umsetzung von S1 = 100 % ≙ 3,5 pMol DNP-Gruppen je pMol S1-Protein. Die folgenden drei Spalten zeigen die prozentualen Unterschiede gegenüber den Umsetzungen in der ersten Spalte. In der letzten Spalte stehen die Ausbeuten an Protein nach der zweidimensionalen Gelelektrophorese bezogen auf die zur Extraktion eingesetzten Ribosomen. Unterstrichen sind Unterschiede, die wenigstens den doppelten mittleren Fehler ausmachen.

Tabelle 2a.

	Reaktion mit FDNB (S1 = 100) (n = 5)	Prozentuale Änderung der Umsetzung durch Poly(U) (n = 3)	Poly(U)+tRNA^{Phe} (Hefe) (n = 3)	tRNA^{Phe} (Hefe) (n = 3)	Ausbeute pMol Protein / pMol Ribosomen
S1	100 ± 6	21 ± 30	117 ± 130	4 ± 34	0,016
S2	18 ± 0,75	74 ± 48	8 ± 14	51 ± 30	0,06
S3	20,5 ± 4	7 ± 11	70 ± 44	32 ± 28	0,11
S4	21,5 ± 3,5	10 ± 8	6 ± 6	-3 ± 5	0,1
S5[x]	-	-	-	-	-
S6[x]	-	-	-	-	-
S7	21 ± 2	38 ± 40	56 ± 27	28 ± 32	0,08
S8	11,5 ± 0,4	12 ± 11	7 ± 18	28 ± 50	0,06
S9	10 ± 2	68 ± 50	24 ± 16	32 ± 27	0,16
S10	10,5 ± 1	11 ± 11	14 ± 14	0 ± 15	0,08
S11	14,5 ± 0,75	0 ± 61	3 ± 35	53 ± 19	0,02
S12	13 ± 3,2	-40 ± 7	-16 ± 8	-19 ± 19	0,02
S13	7 ± 0,9	22 ± 14	4 ± 18	-3 ± 15	0,1
S14	9,5 ± 1,65	88 ± 105	54 ± 10	65 ± 70	0,04
S15	4 ± 0,35	2 ± 18	9 ± 18	-7 ± 24	0,16
S16	7,5 ± 2	-10 ± 32	20 ± 40	-23 ± 6	0,08
S17[x]	-	-	-	-	-
S18	9,5 ± 0,75	8 ± 9	60 ± 3	71 ± 73	0,12
S19	9 ± 0,8	4 ± 12	10 ± 13	-44 ± 5,5	0,14
S20[xx]	-	-	-	-	-
S21	15 ± 2,2	7 ± 21	44 ± 13	-15 ± 17	0,08

x nicht auswertbar
xx S20 und L26 wurden nicht aufgetrennt

Tabelle 2b

Reaktion mit FDNB (S1 = 100) (n = 5)	Prozentuale Änderung der Umsetzung durch			Ausbeute
	Poly(U) (n = 3)	Poly(U)+tRNA^{Phe}(Hefe) (n = 3)	tRNA^{Phe}(Hefe) (n = 3)	pMol Protein / pMol Ribosomen
L1 8 ± 0,5	11 ± 14	-3 ± 10	-3 ± 8	0,4
L2 23 ± 4	12 ± 25	29 + 34	6 ± 31	0,1
L3 7 ± 2,5	1 ± 14	11 ± 8	-14 ± 7	0,52
L4 16,5 ± 2,5	72 ± 35	10 ± 25	125 ± 136	0,08
L5 22 ± 3	5 ± 22	-1 ± 29	2 ± 24	0,12
L6 15,5 ± 2,5	-26 ± 1	-20 ± 22	17 ± 20	0,08
L7 4 ± 0,3	-14 ± 7	-16 ± 7	-14 ± 3	0,45
L8^{x} -	-	-	-	-
L9 5 ± 0,8	6 ± 20	-3 ± 20	-7 ± 27	0,36
L10 21 ± 1,5	19 ± 11	-8 ± 10	71 ± 80	0,12
L11 13,5 ± 1	35 ± 7	6 ± 9	-16 ± 2,5	0,4
L12^{x} -	-	-	-	-
L13 12,5 ± 0,35	25 ± 5	14 ± 9	10 ± 13	0,12
L14 3,5 ± 0,25	25 ± 27	7 ± 12	-16 ± 17	0,16
L15 3,5 ± 0,25	28 ± 20	7 ± 28	5 ± 20	0,88
L16 9 ± 15	10 ± 25	18 ± 10	20 ± 35	0,12
L17 7,5 ± 1,5	29 ± 26	0 ± 12	7 ± 14	0,3
L18 6 ± 0,75	16 ± 19	8 ± 23	-3 ± 10	0,68
L19 7,5 ± 0,1	34 ± 26	26 ± 31	4 ± 24	0,28
L20 9,5 ± 1	61 ± 53	50 ± 65	95 ± 9	0,05

Tabelle 2b, Forts.

	Reaktion mit FDNB (S1 = 100) (n = 5)	Prozentuale Änderung der Umsetzung durch Poly(U) (n = 3)	Poly(U)+tRNA^{Phe}(Hefe)	tRNA^{Phe}(Hefe) (n = 3)	Ausbeute pMol Protein / pMol Ribosomen
L21	6,5 ± 0,9	49 ± 6	104 ± 57	312 ± 50	0,056
L22	4 ± 0,4	14 ± 25	27 ± 12	-4 ± 11	0,48
L23	15 ± 1,3	17 ± 14	-4 ± 2,5	17 ± 24	0,14
L24	1 ± 0,04	-1 ± 10	24 ± 29	-30 ± 4	0,8
L25	4 ± 0,65	55 ± 23	-4 ± 9	-11 ± 12	0,4
L26^{xx}	4 ± 0,65	35 ± 23	18 ± 19	-11 ± 20	0,2
L27	8 ± 0,25	3 ± 18	42 ± 45	3 ± 30	0,14
L28	6 ± 1,4	170 ± 160	100 ± 53	94 ± 70	0,04
L29	1,1 ± 0,1	6 ± 17	50 ± 29	19 ± 48	0,24
L30	0,7 ± 0,08	38 ± 18	105 ± 22	57 ± 70	0,12
L31^{x}	-	-	-	-	-
L32^{x}	-	-	-	-	-
L33	2 ± 0,08	-46 ± 16	45 ± 28	-24 ± 35	0,48
L34^{x}	-	-	-	-	-

x nicht auswertbar

xx L26 und S20 wurden nicht aufgetrennt

E DISKUSSION DER UMSETZUNGEN VON RIBOSOMENPROTEINEN

Mindestens 200 Gruppen je E.coli-Ribosom lassen sich mit Arylhalogeniden umsetzen. Biologische Aktivitäten wie die Fähigkeit zur Bindung von Poly(U) oder Aminoacyl-tRNA, erst recht aber zur Synthese von Poly(Phe) werden schon bei wesentlich niedrigeren Umsetzungsgraden schwer beeinträchtigt. Selbst innerhalb einer Umsetzung von nur 60 Gruppen je Ribosom ergaben sich bei mindestens 2/5 der Ribosomenproteine akzelerierte Umsetzungsgeschwindigkeiten. Es muß also mit Konformationsänderungen gerechnet werden, die durch Umsetzung von relativ schnell mit Arylhalogeniden reagierenden Gruppen ausgelöst werden.

Bei dem sehr komplexen System Ribosom eignen sich nur relativ schnell reagierende Gruppen, um eine Affinitätsmarkierung oder eine differenzierte Markierung von Substrat-Bindestellen durchzuführen. Die für eine Affinitätsmarkierung in Frage kommende Modifikation bestimmter tRNA-Spezies mit einem Arylhalogenid wird in den nächsten Teilen beschrieben bzw. diskutiert werden. Im vorangehenden ging es um Probleme einer differenzierten Markierung. Hierfür kommt nicht das sonst übliche Vorgehen in Betracht, zunächst a l l e reaktiven Gruppen unter Schutz - z.B. durch Poly(U) - abreagieren zu lassen, um in einer nachfolgenden Reaktion nach Entfernung des Schutzstoffes die bisher geschützten Gruppen zur Reaktion kommen zu lassen. Solange man aber die Analyse nicht zu den einzelnen reaktiven Gruppen der Ribosomenproteine vorangetrieben hat, bleibt auf der Ebene der einzelnen Proteine nur die Möglichkeit, Indizien für die Aussichten sowie geeignete Bedingungen einer solchen weiteren Analyse zu erfahren. Die beobachteten

großen, teilweise Vorzeichen veränderten Unterschiede im Reaktionsverhalten einzelner Proteine ermutigen zu eingehenderen Untersuchungen, jedoch sind bei der Interpretation der vorliegenden Befunde folgende Gesichtspunkte zu beachten:

1. Es reagieren verschiedene Gruppen, nämlich SH-, NH_2-, phenolische OH- und Imidazolyl-Gruppen, mit unterschiedlicher, in dieser Reihenfolge abnehmender Geschwindigkeit.

2. Diese Gruppen können aus sterischen Gründen inaktiv sein und eventuell durch bereits erfolgte Reaktionen reaktiv werden (Konformationsänderungen).

3. Effekte von zugesetzten Stoffen (Poly(U), tRNA) können direkt (z.B. Schutz durch Abdeckung reaktiver Gruppen) oder indirekt zustandekommen (allosterische Konformationsänderungen).

4. Die an einem Protein gemessenen Effekte entsprechen der Summe aller einzelnen, u.U. entgegengesetzt gerichteten Effekte.

5. Außerdem sind folgende Annahmen zu machen (b - f sind besonders bei Vergleichen der Unterschiede im zweiten Reaktionsintervall bedeutsam):

a) Es gelang, durch großzügiges Ausstechen der Proteinflecke mitsamt einem gewissen Umkreis, Fehler durch reaktionsbedingte Ladungsverluste gering zu halten.

b) Proteinverluste bei der Saccharosegradienten-Sedimentation nach dem ersten Reaktionsintervall waren unbeeinflußt von den im ersten Intervall variierten Bedingungen.

c) Die sonstigen Verluste in der zweidimensionalen Elektrophorese betrafen stärker und schwächer modifizierte Moleküle des gleichen Proteins im selben Ausmaß. (Unterschiedliche Verluste bei verschiedenen Proteinen wären dagegen durch die Messung der Doppelmarkierung

in den DNP- und den Proteinmengen der Flecken beim Vergleich der normierten Umsetzungswerte nicht ins Gewicht gefallen.)

d) Die im ersten Intervall alternativ durchgeführte Reaktion mit F_2DNB erreichte nicht nur die gleiche Gesamtumsetzung wie die mit [^{3}H]FDNB, sondern verlief auch bei den einzelnen Proteinen und ihren Gruppen quantitativ gleich. (F_2DNB und eine niedere Temperatur wurden einer gleichen Reaktion mit unmarkiertem FDNB vorgezogen, um die Ribosomen möglichst zu schonen).

e) Nach Entfernen der "Schutzstoffe" (Poly(U), tRNA), also zu Anfang des zweiten Reaktionsintervalls, waren die Konformationen der vorher "geschützten" und der Vergleichsribosomen identisch.

f) Die auf S1 normierten relativen Umsetzungen verliefen über 2,5 h mit linearer Geschwindigkeit.

Es ist klar, daß angesichts dieser Gesichtspunkte und Annahmen auf eine definitive Interpretation weitgehend verzichtet werden muß. Außerdem können nur die größeren Effekte als gesichert angesehen werden, insbesondere diejenigen, die bei guter Meßgröße den dreifachen mittleren Fehler übersteigen.

S1 eignet sich als Bezugsprotein, da es nicht nur maximale, sondern auch über das erste und zweite Beobachtungsintervall konstante Umsetzungsgeschwindigkeit aufweist. Es erreichte im ersten Intervall von 5 h 7,0 Mol DNP-Gruppen je Mol Protein, im zweiten Intervall von 2,5 h 3,5 Mol DNP-Gruppen je Mol Protein. Da in den Abb. 4, 7, 16, 17 und 18 alle übrigen Umsetzungen in Mol DNP je Mol Protein

auf die Umsetzung von S1 normiert sind, entsprechen gleiche Ordinatenwerte im ersten und zweiten Intervall jeweils gleichen Umsetzungsgeschwindigkeiten. Die prozentualen Änderungen unter der Wirkung von Poly(U) und Substraten mit ihren mittleren Fehlern sieht man dagegen in den Tabellen 1 und 3. Zu diskutieren sind nun die größeren Effekte in den beiden Beobachtungsintervallen und ihre Beeinflussung durch Poly(U) und $tRNA^{Phe}$.

Die Kinetik der Umsetzung einzelner Proteine im ersten und zweiten Intervall, also im Anfang der - nur pauschal verfolgten - Gesamtkinetik (Abb. 16) läßt die Proteine in 3 Typen gliedern:

1. Gleiche Reaktionsgeschwindigkeit im ersten und zweiten Intervall. Beispiele: S1, S7 und L13.

Eine "konstante Anfangsgeschwindigkeit" kann durchaus Überlagerung der Umsetzung von überwiegend im ersten Intervall schnell reagierenden Sulfhydrylgruppen und einer akzelerierten Umsetzung anderer Gruppen im zweiten Intervall zustandekommen. Dafür ergaben sich für S1 in den Versuchen mit Poly(U) bzw. Poly(U) und $tRNA^{Phe}$ Hinweise.

2. Hohe Anfangsgeschwindigkeit, geringe Reaktion im zweiten Intervall. Beispiele: S18, S21 sowie L27 und L28.

Hohe Anfangsgeschwindigkeiten dürften dem schnellen Reagieren einiger SH-Gruppen entsprechen, die für S1, S18 und S21 durch Reaktion mit N-Äthylmaleimid nachgewiesen sind (35, 45). Innerhalb der 50-Untereinheit sollten die SH-Gruppen von S28 am reaktivsten sein, danach die von L27, L2, L6, L4, L17 und L20 (47), was durch die Umsetzungen mit FDNB zum Teil bestätigt werden kann.

3. Akzelerierende Reaktion, weitaus schnellere Reaktion im zweiten Intervall. Beispiele: S2, S3, S4, S8, S9, S11, S13, S16, S19 sowie L1, L2, L3, L4, L5, L6, L10, L11, L16, L20.

Die akzelerierte Reaktion betrifft die meisten Ribosomenproteine; bei den genannten 19 Proteinen war die Umsetzungsgeschwindigkeit im zweiten Intervall mindestens verdoppelt. Daher dürfte dieses Phänomen durch Auflockerung weiterer Teile der Ribosomenstruktur infolge partieller Umsetzungen mit FDNB zustandekommen.

Im Poly(U)-Ribosom-Komplex ist die Reaktivität der meisten Proteine größtenteils signifikant (bis auf 1/3) erniedrigt. Da S1 die mRNA-Bindung stimuliert (106), unter UV-Bestrahlung kovalent mit Poly(U) oder Poly(s^4U) reagiert (76), und schließlich durch Poly(U) gegen tryptischen Abbau geschützt wird (108), wäre eine direkte Schutzwirkung bei S1 plausibel. Eine globale Wirkung von Poly(U) scheint jedoch nicht durch direkten Schutz der Proteine erklärlich. Sie dürfte weitgehend auf einer allgemeinen Konformationsänderung (Verdichtung) beruhen. Es fällt auf, daß S18 im Rahmen der Meßgenauigkeit unverändert reagiert. Von diesem Protein ist bekannt, daß es im Ribosom mit mRNA-Modellen in Kontakt kommt (71-73, 77); im übrigen ist wohl auch hier mit der Möglichkeit einer gewissen Netto-Erniedrigung von Reaktivitäten durch Poly(U)-Komplexierung zu rechnen. Daher läßt sich vermuten, daß eine Verdichtung der Konformation entweder speziell S18 nicht berührt oder aber auch dieses in einem Teil seiner Gruppen reaktiver macht.

Nach Entfernung von Poly(U) aus partiell arylierten Ribosomenkomplexen ließen sich etliche Proteine nach ihrem weiteren Reaktionsverhalten wiederum 3 Typen zuordnen; bei zahlreichen Proteinen war jedoch hier eine Entscheidung wegen geringer Ausbeuten bzw. Umsetzungen oder großer mittlerer Fehler nicht möglich.

1. Reaktionsgeschwindigkeit nicht oder kaum beeinflußt durch (wieder entferntes) Poly(U). Beispiele: S3, S4, S18, S19 und L5.
2. Reaktionsgeschwindigkeit durch (wieder entferntes) Poly(U) herabgesetzt. Beispiele:S12 und L6.
3. Reaktionsgeschwindigkeit durch (wieder entferntes) Poly(U) erhöht. Beispiele: S2 (unsicher), L4, L11, L13, L21. In allen Fällen war die Geschwindigkeit im ersten Intervall erniedrigt und daraufhin im zweiten Intervall erhöht. Es könnten hier direkte Schutzwirkungen vorliegen, nach deren Aufhebung die betroffene Gruppe(n) "zusätzlich" reagieren.

Zusätzlich mit Poly(U) anwesende $tRNA^{Phe}$ wirkte sich bei keinem der Proteine im ersten Intervall deutlich aus. Nach Entfernung von Poly(U) und $tRNA^{Phe}$ zeigten jedoch einige Proteine auffallende Einflüsse der $tRNA^{Phe}$:
Erhöhte Reaktionsgeschwindigkeit. Beispiele: S3 (unsicher), S18 und S21. Poly(U) "schützt" zwar im ersten Intervall bei S3 und S21; in jedem der 3 Fälle führt aber nur die tRNA zu einer erhöhten Reaktionsgeschwindigkeit im zweiten Intervall. Diese "nachträglichen" Förderungen der Reaktivität einzelner Proteine könnten vielleicht als Folgen einer Ribosomenaktivierung durch tRNA zu interpretieren sein. Bei S21 scheint es sich um eine auch Poly(U)-abhängige tRNA-Wirkung zu handeln; bei S3 (unsicher), S18 und vielleicht auch S11 gehen die Förderungen jedoch anscheinend von $tRNA^{Phe}$ alleine aus.

$tRNA^{Phe}$ alleine bewirkte - nach Wiederentfernung - bei L-Proteinen zweierlei Effekte:
1. Erniedrigung der Reaktionsgeschwindigkeit. Beispiele: L3, L7 und L11.

2. Erhöhung der Reaktionsgeschwindigkeit. Beispiele: L20 und L21. Für Vergleiche mit etwaigen Effekten der $tRNA^{Phe}$ auf die Reaktion im ersten Intervall stehen keine Daten zur Verfügung.

Für die Aktivität von Ribosomen in der Phe-tRNA-Bindung und erst recht in der empfindlicheren Poly(Phe)-Synthese dürften vor allem reaktive Gruppen der besonders schnell reagierenden Proteine S18, S21 und L28 von Bedeutung sein. Generell muß festgestellt werden, daß alle weitergehenden Zuordnungen und Deutungen erst durch die Identifizierung einzelner reagierender Gruppen und ihrer Position im Protein möglich werden.

F REAKTION VON FDNB MIT TRANSFERRIBONUCLEINSÄUREN

1. Einführung

Chemische Reaktivitäten der verschiedenen Basen innerhalb der tRNA können wertvolle Hinweise auf die dreidimensionale Struktur und auf ihre Funktion geben. Modifikationen mit verschiedenen Reagenzien wurden besonders an der $tRNA^{Phe}$ (Hefe) (115-120), aber auch an tRNAs von E.coli durchgeführt (121-125). Hierbei sind die Basen in den doppelhelikalen Bereichen der tRNA nicht reaktiv, und man nimmt ebenfalls an, daß chemische Reaktion mit einer Base vermindert ist, wenn diese die Tertiärstruktur der tRNA aufgrund von "Stacking", "Intercalation" oder Basenpaarung aufrechterhält (126, 127). Nur sterisch erreichbare Basen können also mit chemischen Reagenzien modifiziert werden. Im allgemeinen sollte das CCA-Ende, der Anticodon-Arm, Teile der Dihydrouridin-Schleife und des Extra-Armes einer Reaktion gut zugänglich sein, während der TΨC-Arm nicht modifiziert wird (20).

Über die Reaktion von FDNB mit Nucleinsäuren ist sehr wenig bekannt; die Reaktion mit 3'-Phosphaten der Nucleoside wurde näher untersucht (128).
In der Hoffnung, dadurch eine Affinitätsmarkierung mit einem bifunktionalen Reagenz vorbereiten zu können wurde zunächst angestrebt, tRNA unter schonenden Bedingungen mit diesem monofunktionellen Arylhalogenid umzusetzen. Reaktivitätsunterschiede einiger tRNAs von E.coli sollten mit ihren verschiedenen Basenzusammensetzungen in Zusammenhang gebracht werden. Abb. 19 zeigt die allgemeine Sekundärstruktur einer tRNA.

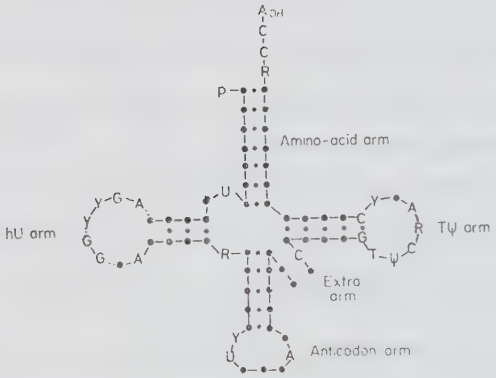


Abb. 19. Allgemeine Sekundärstruktur einer tRNA. Große Buchstaben zeigen die Nucleotide an, die in fast allen tRNA-Sequenzen gleich sind und p ist 5'-terminales Phosphat.
Y = Pyrimidin-Nucleotid, R = Purin-Nucleotid (nach Cramer 126).

2. Ergebnisse

a) Einfluß des pH-Wertes auf die Reaktionsgeschwindigkeit von $tRNA^{Phe}$ (Hefe) mit FDNB

Wie aus Abb. 20 hervorgeht, ist der Umsetzungsgrad der $tRNA^{Phe}$ (Hefe) mit FDNB sehr stark vom pH-Wert abhängig. Bei pH 7,2 fand nur minimale Reaktion statt, während im leicht alkalischen Bereich eine erhebliche Reaktionszunahme festzustellen war. Doch war auch hierbei eine lange Inkubationsdauer für ausreichende Modifikation unvermeidlich. Im weiteren Verlauf der Arbeit wurde der pH-Wert von 8,5 vorgezogen, um tRNA möglichst schonend umzusetzen. Außerdem wurde darauf verzichtet, Mg^{2+} zu entfernen oder die Reaktion in 80%igem DMSO ablaufen zu lassen. Hierbei könnte man zwar eine höhere Umsetzung erreichen (129), doch läge die tRNA dabei nur in denaturierter Form vor (130).

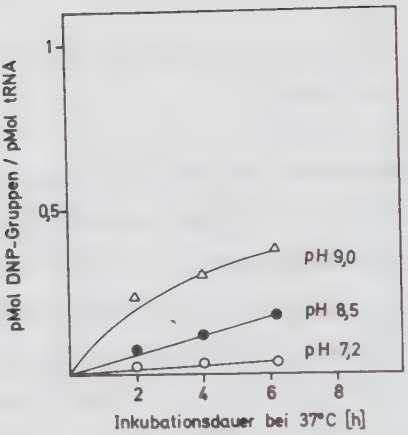


Abb. 20. Einfluß des pH-Wertes auf die Reaktionsgeschwindigkeit von FDNB mit $tRNA^{Phe}$(Hefe). Die Reaktion wurde in 25 mM Triäthanolamin-HCl, 60 mM KCl, 15 mM $MgCl_2$ bei 37 °C durchgeführt. Die Konzentration von [^{3}H]FDNB mit 100 µl-Reaktionsgemisch betrug 2,5 mM. Eingesetzt wurden dabei 2 A_{260}-E. $tRNA^{Phe}$(Hefe). 30 µl-Aliquote wurden auf GF/A-Filter plattiert, in eiskalte 10%ige TCA gestellt, 2 mal 1 min in 5 % TCA, 2 mal 1,5 min in Äther/Äthanol und 1 mal 1 min in Äther gewaschen. Nach Trocknung wurden die Filter zur Radioaktivitätsmessung gebracht.

b) Reaktion von FDNB mit tRNA(Hefe) und tRNA(E.coli)

Wie aus Abb. 21 ersichtlich, reagieren tRNA(Hefe) und tRNA(E.coli) mit unterschiedlicher Geschwindigkeit, vermutlich auch in verschiedenem Ausmaß mit FDNB. Als reaktive Gruppen sind bei der tRNA(Hefe) die Aminogruppen der Basen Adenin, Guanin und Cytosin verfügbar. Bei der tRNA(E.coli) könnten außer diesen die SH-Gruppe des 4-Thiouridins reagieren, die fast alle untersuchten spe-

zifischen tRNAs von E.coli besitzen (122), ferner die SH-Gruppe des 5-Methylaminomethyl-2-Thiouridins in $tRNA_2^{Glu}$ und $tRNA^{Lys}$ (131) sowie die SH-Gruppe des 2-Thiocytidins in $tRNA^{Arg}$ und $tRNA_3^{Ser}$ (122, 131). Die Aminogruppe der seltenen Base "X" in $tRNA^{Phe}$, $tRNA^{Lys}$, $tRNA^{Arg}$ und $tRNA^{Ile}$ (133, 134, 135 und 136) mag ebenfalls reaktionsfähig sein. Abb. 22 zeigt die Struktur dieser seltenen Nucleoside mit ihren gebräuchlichen Abkürzungen.

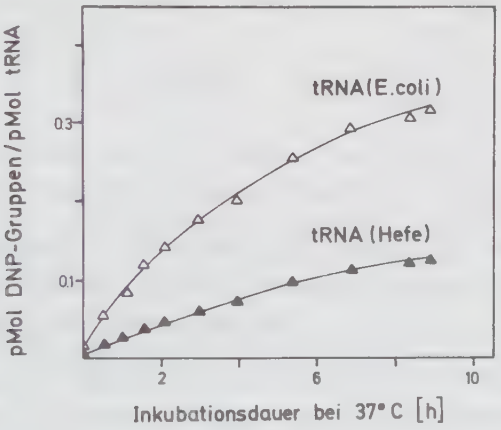


Abb. 21. Reaktion von FDNB mit tRNA(Hefe) und tRNA(E.coli). Die Reaktion wurde bei pH 8,5 in 25 mM Triäthanolamin-HCl, 60 mM KCl, 15 mM $MgCl_2$ bei 37 °C durchgeführt. Die Konzentration von [^{3}H]FDNB betrug 2,5 mM. Fortdauer der Reaktion wurde wie unter Abb. 18 beschrieben gemessen.

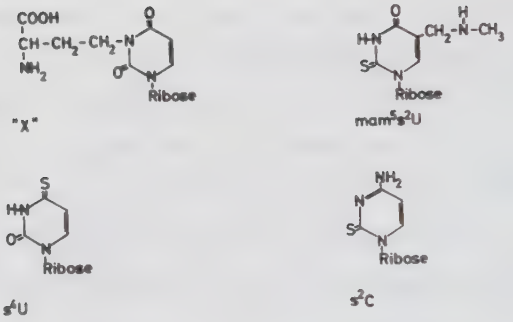


Abb. 22. Struktur von 4 seltenen Nucleosiden in E.coli-tRNA (136)

c) Reaktion von spezifischen tRNA(E.coli) mit FDNB

Wie aus Abb. 23 hervorgeht, zeigen verschiedene spezifische tRNAs von E. coli einen unterschiedlichen Reaktionsverlauf mit FDNB. So reagieren $tRNA_f^{Met}$ und $tRNA^{Tyr}$ sehr langsam. Ihr Umsetzungsgrad ist nach 6 Stunden 15 Minuten so groß wie der von $tRNA^{Phe}$ (Hefe) (s. Abb. 20). Die $tRNA_1^{Val}$ und $tRNA^{Gly}$ zeigen ähnliche Umsetzungsgeschwindigkeiten wie $tRNA_f^{Met}$ und $tRNA^{Tyr}$. Die Reaktionsgeschwindigkeit von $tRNA^{Phe}$ ist dagegen ziemlich hoch. Alle fünf spezifischen tRNAs von E.coli haben 4-Thiouridin in ihrer Sequenz (122, 132), so daß andere Basen für die unterschiedliche Reaktion eine Rolle spielen müssen. Auffallend ist besonders die Kinetik der Umsetzung von $tRNA_2^{Glu}$ mit FDNB. Nach einer sehr schnellen Anfangsgeschwindigkeit, in der etwa 1 pMol FDNB pro pMol tRNA umgesetzt wird, läuft die Reaktion nur sehr langsam weiter. Ähnlich stark wie $tRNA_2^{Glu}$ reagiert $tRNA^{Lys}$ mit diesem Arylhalogenid. Die Sekundärstrukturen dieser beiden tRNAs von E.coli zeigt Abb. 24.

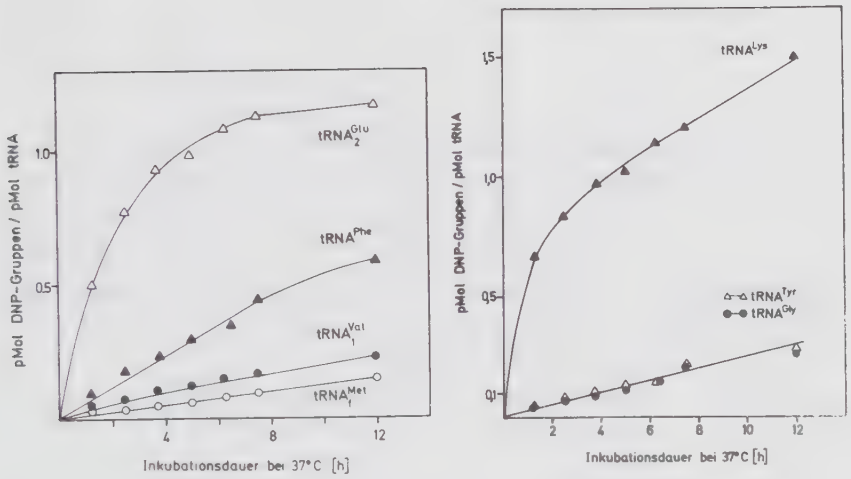


Abb. 23. Reaktion von spezifischen tRNAs von E.coli mit [^{3}H]FDNB. Die Reaktion wurde bei pH 8,5 in 25 mM Triäthanolamin-HCl, 60 mM KCl, 15 mM $MgCl_2$ durchgeführt. Im 100 µl Gemisch befanden sich 2 A_{260}-E. tRNA und 0,2 µMol [^{3}H]FDNB. Inkubiert wurde bei einer Temperatur von 37 ^{o}C. Aliquote von 10 µl wurden zum Stoppen der Reaktion in eiskalte 10%ige TCA gestellt, dann 2 x 1 min mit 5 % TCA, 2 x 1 min mit Äther/Äthanol (1:1) und 1 min mit Äther gewaschen und nach Trocknung zur Radioaktivitätsmessung gebracht.

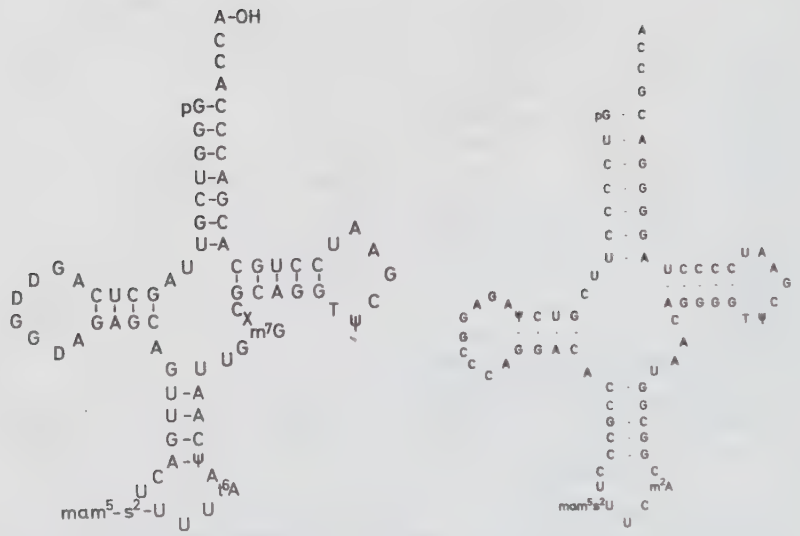


Abb. 24. Sekundärstruktur der $tRNA^{Lys}$ (linkes Bild) und Sekundärstruktur der $tRNA_2^{Glu}$ (nach 135 u. 136).

d) Einfluß der Modifizierung mit FDNB auf die Akzeptoraktivität der tRNA

Wie aus Tabelle 4 ersichtlich zeigt die $tRNA^{Phe}$ nur geringen Rückgang der Akzeptoraktivität, obwohl sie mit FDNB gut reagiert. Von $tRNA_f^{Met}$ und $tRNA^{Tyr}$ war bei ihrer geringen Reaktionsfähigkeit keine Änderung zu erwarten. Interessant ist das Verhalten der $tRNA_2^{Glu}$. Das reaktionsfähige, mit FDNB sehr schnell (siehe Abb. 23) umgesetzte Nucleotid, scheint in hohem Maße in der tRNA für die Akzeptoraktivität wichtig zu sein. Daher wahrscheinlich die Inaktivierung der $tRNA_2^{Glu}$

durch FDNB auf 23 % der Normalaktivität. Die $tRNA^{Lys}$ reagiert zwar ebenfalls sehr schnell und sogar in einem etwas höheren Ausmaß als die $tRNA_2^{Glu}$, verliert dabei aber nur ein Viertel ihrer Beladbarkeit.

Tabelle 4. Einfluß von Modifizierung mit FDNB auf die Beladbarkeit verschiedener tRNAs von E.coli. Die Beladung wurde wie unter Methoden beschrieben durchgeführt.

	pMol DNP / pMol tRNA	pMol AA / 100 pMol tRNA		Restaktivität
		nicht modifiziert	mit FDNB modifiziert	
$tRNA^{Phe}$	0,62	10,2	9,8	96 %
$tRNA_f^{Met}$	0,13	15,0	15,3	102 %
$tRNA_2^{Glu}$	1,23	33,3	7,2	23 %
$tRNA^{Tyr}$	0,13	33	32,5	98 %
$tRNA^{Lys}$	1,41	30,6	23,3	76 %

e) Analyse der mit FDNB modifizierten $tRNA^{Phe}$

Um festzustellen, welche Base(n) der $tRNA^{Phe}$ durch [^{3}H]FDNB modifiziert werden, wurde die $tRNA^{Phe}$ zuerst einer Spaltung mit Ribonuclease T_1 unterworfen. Dieses Enzym spaltet Ribonucleinsäuren spezifisch nach der Base G. Die Verdauung der $tRNA^{Phe}$ ergibt 24 Bruchstücke, die durch Chromatographie an Cellulose aufgetrennt werden können.

In Abb. 25 ist in der 2-dimensionalen Struktur der E.coli $tRNA^{Phe}$ angezeigt, an welchen Stellen die Ribonuclease T_1 angreift. Das Enzym spaltet neben G und liefert 3'-(terminale) Phosphorsäureester.

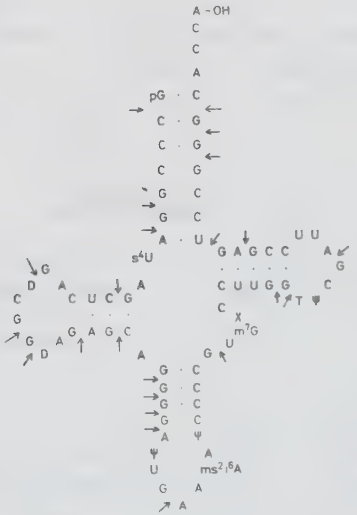


Abb. 25. Kleeblattmodell der $tRNA^{Phe}$ (E.coli) mit den Angriffsstellen der Ribonuclease T_1 (nach 136)

Durch Ribonuclease T_1 in Gegenwart von alkalischer Phosphatase hergestellte Oligonucleotide aus tRNA lassen sich auf einer Cellulosedünnschichtplatte nach Größe und Ladung auftrennen. Während aber die Trennschärfe der kürzeren Sequenzen sehr gut ist, ist bei den längeren Sequenzen ein Überlappen nicht immer ganz auszuschließen (s. Abb. 26). Dies, obwohl in der ersten Dimension dreimal und in der zweiten Dimension zweimal chromatographiert wurde. Die Radioaktivitätsverteilung der mit [^{3}H]FDNB markierten Oligonucleotide (Abb. 27) zeigt, daß

die $tRNA^{Phe}$ (E.coli) spezifisch mit diesem Reagenz reagiert. Die Hauptradioaktivität wurde in Fleck 2 gefunden. Ein größerer Anteil war auch in Fleck 5 vorhanden. Dafür könnte grundsätzlich eine unzulängliche Trennschärfe verantwortlich sein; die Nucleosidanalyse der Oligonucleotide spricht jedoch dafür, daß in Fleck 5 ein Derivat von Fleck 2 vorliegt. Erwähnt sei, daß der prozentuale Anteil der in Fleck 5 gefundenen Radioaktivität erheblich geringer sein konnte (weniger als 10 %).

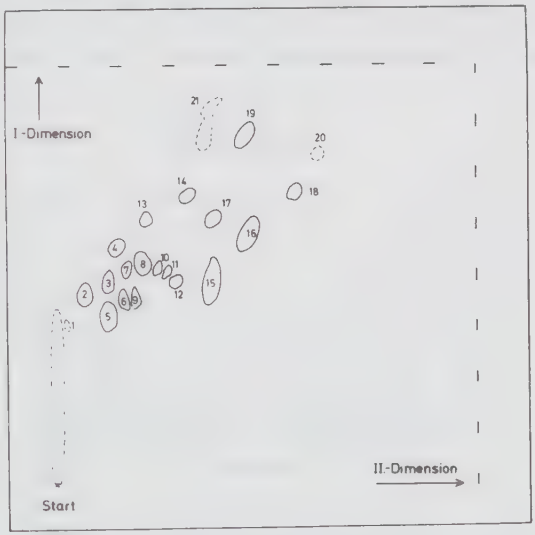


Abb. 26. Trennung der Oligonucleotide von $tRNA^{Phe}$ (E.coli) auf einer Cellulosedünnschichtplatte nach Spaltung mit Ribonuclease T_1. Die enzymatische Spaltung der tRNA erfolgte im 50 µl-Reaktionsgemisch mit 5 µl 1 M $(NH_4)_2CO_3$ pH 7,6, 5 µl 0,04 M EDTA, 5 µl alkalischer Phosphatase (5 mg/ml), 3 µl Ribonuclease T_1 (10 E/1 µl) und 2 A_{260}-E. $tRNA^{Phe}$ (E.coli). Die Inkubationsdauer betrug 3 h bei einer Temperatur von 37 °C. Danach wurde bis zur Trockene eingeengt und in 5 µl H_2O

aufgenommen. Die so erhaltenen Oligonucleotide wurden auf eine 20 x 20 cm Cellulosedünnschichtplatte der Firma Merck aufgetragen.
Das Fließmittel in der 1. Dimension war Propanol : konz. NH_3: H_2O (55 : 10 : 35 v/v/v) und in der 2. Dimension Isobuttersäure: H_2O : konz. NH_3 (66 : 33: 1 v/v/v) (137). Zur besseren Trennung wurde in der 1. Dimension 3mal und in der 2. Dimension 2mal chromatographiert.
Die unter UV-Licht sichtbaren Oligonucleotide wurden von der Platte abgekratzt, in Eppendorfplastikröhrchen gegeben und mit 0,5 ml H_2O eluiert. Hierzu wurde 30 min bei Raumtemperatur geschüttelt und dann das Cellulosepulver abzentrifugiert.
Bei radioaktiv markierten Proben wurden 10 ml Unisolve zur Radioaktivitätsmessung zugegeben.

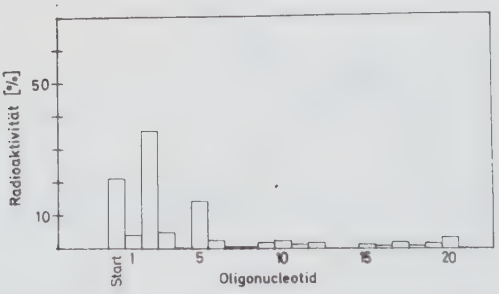


Abb. 27. Radioaktivitätsverteilung nach Trennung der Oligonucleotide von $tRNA^{Phe}$ auf einer Cellulosedünnschichtplatte. Die Bezifferung der Oligonucleotide erfolgte nach Abb. 26. Die Messung der Radioaktivität wurde wie unter Abb. 26 beschrieben durchgeführt.

Die durch enzymatische Verdauung mit Ribonuclease T_1 erhaltenen Oligonucleotide der $tRNA^{Phe}$ (E.coli) wurden an einer DEAE Sephadex A25-Säule aufgetrennt. Die Radioaktivitätsverteilung bei vorhergehender Modifikation der $tRNA^{Phe}$ mit [^{3}H]FDNB läßt ebenfalls vermuten, daß nur ein Oligonucleotid markiert wird (Abb. 28). Da an einer Säule dieser Art die Oligonucleotide der Größe nach eluiert werden sollten, ist es wahrscheinlich das Hexanucleotid oder das Octanucleotid der mit Ribonuclease T_1 enzymatisch verdauten $tRNA^{Phe}$.

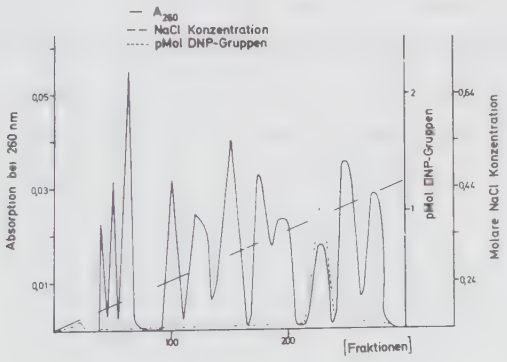


Abb. 28. Trennung der durch Ribonuclease T_1-Spaltung erhaltenen Oligonucleotide von $tRNA^{Phe}$ (E.coli) an einer DEAE Sephadex A25-Säule. 4 A_{260}-E. $tRNA^{Phe}$, mit [^{3}H]FDNB modifiziert, wurden im 100 µl-Gemisch mit 10 µl 1 M $(NH_4)_2CO_3$ pH 7,6, 10 µl 0,04 M EDTA und 6 µl Ribonuclease T_1 (10 E/ µl) 3 Stunden bei 37 °C inkubiert. Die so entstandenen Oligonucleotide wurden auf eine DEAE Sephadex A25-Säule (0,6 x 40 cm) aufgetragen, die mit 0,14 M NaCl in 0,02 M Tris-HCl pH 7,5 und 7 M Harnstoff äquilibriert war. Nach dem Auftragen der Oligonucleotidlösung wurde mit 10 ml Startpuffer

nachgewaschen und anschließend mit einem Gradienten von je 150 ml 0,14 M NaCl und 0,7 M NaCl eluiert. Der Gradient enthielt außerdem 0,02 M Tris-HCl pH 7,5 und 7 M Harnstoff. Die Fließgeschwindigkeit betrug 10 ml/Stunde. Es wurden Fraktionen von 0,5 ml aufgefangen. Jeder Fraktion wurden 100 µl entnommen und zur Radioaktivitätsmessung 2 ml Unisolve zugegeben.

Nucleoside und Oligonucleotide lassen sich mit einem Nucleosidanalysator qualitativ und quantitativ analysieren (138, 139). Dabei werden Nucleoside an einer Kationenaustauschersäule unterschiedlich retardiert, während Nucleotide und Oligonucleotide im Durchbruchvolumen eluiert werden. Eine Charakterisierung der Nucleoside ergibt sich aus dem Elutionsvolumen und dem Quotienten der Absorption bei 260 nm und 280 nm. Abb. 29 zeigt die Trennung der 4 Standardnucleoside U, G, A und C an einer solchen Säule.

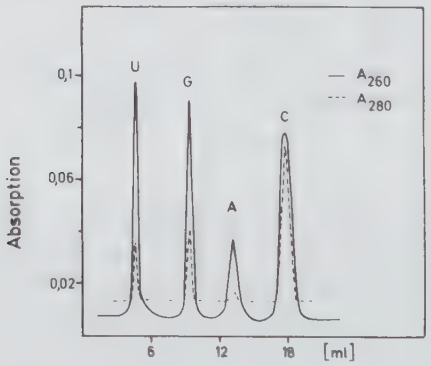


Abb. 29. Trennung der Nucleoside U, G, A und C an einer Kationenaustauschersäule. Es wurden 3,95 nMol U, 3,8 nMol G, 2,05 nMol A und 6,8 nMol C aufgetragen. Säule 0,6 cm Ø x 22 cm, Harz Aminex A 6,

Puffer: 0,4 M $(HCOO)NH_4$ / 0,04 M HCOOH pH 4,65
Fließgeschwindigkeit: 0,2 ml / 44 sec, Druck 6,2 atü
Temperatur: 53,5 °C. Schreiber: 55 mm/Stunde.
Diese Bedingungen einer Hochdruck-Flüssigchromatographie wurden nach Angaben und unter Verwendung der Apparatur von Herrn Dr. G. Schöch, Hamburg anwandt.

Abb. 30 zeigt die Nucleosidanalyse des Oligonucleotids von Fleck 2. Die Trennung zeigt kein Adenosin, während das Verhältnis U : G : C = 2,5 : 1 : 1,7 beträgt. Nach der Basensequenz der $tRNA^{Phe}$ würde dies dem Octanucleotid $GUUCCXm^7GU$ entsprechen. Der zusätzliche Gipfel zwischen U und G könnte sowohl durch abgebautes m^7G, das alkalisch labil ist, als auch durch "X" bzw. einer Mischung beider zustandekommen.

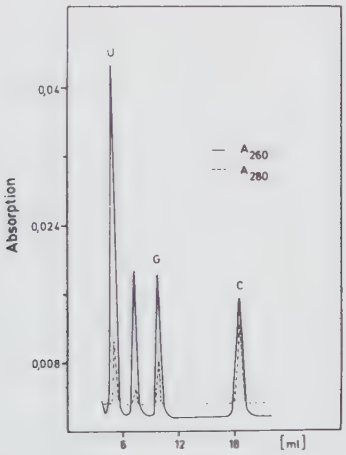


Abb. 30. Trennung der Nucleoside von Oligonucleotid 2 der $tRNA^{Phe}$ (E.coli). Das aus der Celluloseplatte (Fleck 2, Abb.26) mit H_2O eluierte Oligonucleotid, das hierbei mit FDNB nicht umgesetzt war, wurde enzymatisch nach Gassen und Leifer (138) zu den Nucleosiden hydrolysiert. Das Reaktionsgemisch bestand

aus 10 µl Substrat, 5 µl 1 M Ammoniumacetat pH 8,8, 5 µl SVD (5 mg/ml) und 5 µl 0,1 M $MgCl_2$. Die Inkubationsdauer betrug 16 h bei 37 °C. Die so erhaltenen Nucleoside wurden voneinander getrennt wie unter Abb. 29 beschrieben.

G DISKUSSION DER REAKTION VON tRNA MIT FDNB

Spezifisch sind die beobachteten Umsetzungen von tRNA mit FDNB, insofern offenbar nur relativ wenige tRNA-Spezies relativ schnelle Reaktion zeigen und diese nach ihrem Ausmaße bei $tRNA^{Phe}$ und $tRNA_2^{Glu}$ auf eine, bei $tRNA^{Lys}$ aber vermutlich auf zwei Nucleotide je Molekül beschränkt ist. Bei $tRNA^{Phe}$ reagiert das Arylhalogenid wahrscheinlich mit dem an Position 47 stehenden Nucleosid. Die dort befindliche Base "X" besteht aus einem Uridinring, an den in 3-Stellung eine α-Amino-α-carboxypropylgruppe geknüpft ist. Modifikation dürfte daher mit der NH_2-Gruppe dieses Restes erfolgen, da FDNB sehr leicht mit Aminosäuren reagiert. Sterische Effekte mögen aufgrund der voluminösen DNP-Gruppe für das Ausbleiben einer Reaktion mit s^4U oder NH_2-Gruppen normaler Nucleobasen eine wichtige Rolle spielen, insbesondere soweit diese erst bei Denaturierung der tRNA angreifbar werden. Der Akzeptor-Arm, der Dihydrouridin-Arm und das Anticodon sollen als Erkennungsregionen für die tRNA-Synthetase dienen (140, 141); doch mag auch der Extra-Arm bei dieser Erkennung u. U. eine Rolle spielen (142). Ergebnisse von Schulman (143, 144) zeigen, daß der Ort einer Modifikation am Extra-Arm auf die Akzeptoraktivität der tRNA einen Einfluß haben kann. Die Aminosäureakzeptoraktivität der mit FDNB modifizierten $tRNA^{Phe}$ blieb dagegen voll erhalten. Das würde dafür sprechen, daß die Base im Extra-Arm, die mit diesem Arylhalogenid umgesetzt wurde, nicht in kritischer Weise an der tRNA-Synthetase-Bindung teilnimmt.

Die $tRNA^{Lys}$ enthält zwar ebenfalls die Base "X", und zwar in der gleichen Position wie $tRNA^{Phe}$, reagierte jedoch mit weit über einem Mol FDNB je Mol. Ein Vergleich der Basenzusammensetzungen der $tRNA^{Lys}$ und der $tRNA_2^{Glu}$ läßt erkennen, daß beide tRNAs ein mam^5s^2U in der 5'-terminalen Position des Anticodons besitzen. Diese zweite Base in $tRNA^{Lys}$ könnte diejenige sein, welche schneller mit FDNB umgesetzt wird. Nach 1,4 Mol FDNB-Umsetzung je Mol wurde eine Aktivitätsverminderung um 24 % beobachtet. Andererseits scheint einer weitgehenden Umsetzung der einen schnell reagierenden Base mam^5s^2U im Anticodon von $tRNA_2^{Glu}$ eine weitgehende Verminderung der Akzeptoraktivität (77 %) zu entsprechen. Es ist bekannt, daß nach Behandlung dieser Base in $tRNA^{Glu}$ mit CNBr eine verminderte Affinität dieser tRNA zu ihrer Aminoacyl-tRNA-Synthetase eintritt (145, 146).

Für künftige Versuche zu einer Affinitätsmarkierung von ribosomalen tRNA-Bindestellen mit einem bifunktionellen Arylhalogenid kann aus diesen Befunden geschlossen werden, daß dafür an erster Stelle $tRNA^{Phe}$ und an zweiter Stelle $tRNA^{Lys}$ in Betracht kommen. Beide können nach der Modifikation bei leicht alkalischem pH noch praktisch uneingeschränkt mit Aminosäure beladen werden.

G LITERATUR

1. Matthaei, H., Sander, G., Swan, D., Kreuzer, T., Caffier, H., Parmeggiani, A., Naturwissenschaften 55, 281 (1968)

2. Lucas-Lenard, J., Lipmann, F., Ann. Rev. Biochem. 40, 409 (1971)

3. Kurland, C.G., Ann. Rev. Biochem. 41, 377 (1972)

4. Nomura, M. Lengyel, P., Tissieres, A., Ribosomes, Cold Spring Harbor Laboratory (1974)

5. Cox, R.A., Godwin, E., Ribosome Structure and Function MTP Internatioal Review of Science, Biochemistry 7, 179 (1975)

6. Wittmann, H.G., Eur. J. Biochem. 61, 1 (1976)

7. Brownlee, G.G., Sanger, F., Barrell, B.G., J. Mol. Biol. 47, 505 (1970)

8. Fellner, P., Ehresmann, C., Stiegler,P., Ebel, J.-P., Nature New Biol. 239, 1 (1972)

9. Ehresmann, C., Stiegler, P., Fellner, P., Ebel. J.-P., Biochimie, 54, 901 (1972)

10. Fellner, P., Ebel, J.-P., Nature (London) 225, 1131 (1970)

11. Kurland, C.G., Voynow, P., Hardy, S.Y.S., Randall, L., Lutter, L., Cold Spring Harbor Symp. Qant. Biol. 34, 17 (1969)

12. Dzionara, M., Kaltschmidt, E., Wittmann, H.G., Proc. Nat. Acad. Sci. USA 67, 1909 (1970)

13. Kaltschmidt, E., Dzionara, M., Wittmann, H.G., Mol. Gen. Genet. 109, 292 (1970)

14. Stöffler, G., Wittmann, H.G., Proc. Nat. Acad. Sci. USA 68, 2283 (1971)

15. Stöffler, G., Hasenbank, R., Lütgehaus, M., Maschler, R., Morrison, C.A. Zeichhardt, H., Garret, R.A., Mol. Gen. Genet. 127, 89 (1973)

16. Zimmermann, R.A., Muto, A., Fellner, P., Ehresmann, C., Branlant, C., Proc. Nat. Acad. Sci. USA 69, 1282 (1972)

17. Schaup, H.W., Green, M., Kurland, C.G., Mol. Gen. Genet. 112, 1 (1971)

18. Schaup, H.W., Green, M., Kurland, C.G., Mol. Gen. Genet. 109, 193 (1970)

19. Gray, P.N., Garret, R.A., Stöffler, G., Monier, R., Eur. J. Biochem. 28, 412 (1972)

20. Gray, P.N., Bellemare, G., Monier, R., Garrett, R.A., Stöffler, G., J. Mol. Biol. 77, 133 (1973)

21. Yu, R.S.T., Wittmann, H.G., Biochem. Biophys. Acta 324, 375 (1973)

22. Horne, J.E., Erdmann, V.A., Mol. Gen. Genet., 119, 337 (1972)

23. Stöffler, G., Daya, L., Rak, K.H., Garrett, R.A., Mol. Gen. Genet. 114, 125 (1971)

24. Stöffler, G., Daya, L., Rak, K.H., Garrett, R.A., Mol. Gen. Genet. 114, 125 (1971)

25. Garrett, R.A., Müller, S., Spierer, P., Zimmermann, R.A., J. Mol. Biol. 88, 553 (1974)

26. Nomura, M., Mizushima, S., Ozaki, M., Traub, P., Lowry, C.V., Cold Spring Harbor Symp. Quant. Biol. 34, 49 (1969)

27. Chang, F.N., Flaks, J.G., J. Mol. Biol. 68, 177 (1972)

28. Shi, C.T., Craven, G.R., J. Mol. Biol. 78, 651 (1973)

29. Lutter, L.C., Kurland, C.G., Stöffler, G., FEBS Letters 54, 144 (1975)

30. Sommer, A., Traut, R.R., J. Mol. Biol. 97, 471 (1975)

31. Lutter, L.C., Ortanderl, F., Fasold, H., FEBS Letters 48, 288 (1974)

32. Sun, T.-T., Bollen, A., Kahan, L., Traut, R.R., Biochemistry 13, 2334 (1974)

33. Traut, R.R., Haenni, A.L., Eur. J. Biochem. 2, 64 (1967)

34. Retsema, J.A., Conway, T.W., Biochem. Biophys. Acta 179, 369 (1969)

35. Moore, P.B., J. Mol. Biol. 60,169 (1971)

36. Tamaoki, T., Myazawa, F., J. Mol. Biol. 23, 35 (1967)

37. Myazawa, F., Tamaoki, T., J. Mol. Biol. 24, 485 (1967)

38. Craven, G.R., Gupta, V., Proc. Nat. Acad. Sci. USA 67, 1329 (1970)

39. Moore, P.B., J. Mol. Biol. 22, 145 (1966)

40. Retsema, J.A., Conway, R.W., J. Mol. Biol. 55, 457 (1971)

41. Acharya, A.S., Moore, P.B., J. Mol. Biol. 76, 207 (1973)

42. Hsiung, N., Cantor, C.R., Arch. Biochem. Biophys. 157, 125 (1975)

43. Hsiung, N., Cantor, C.R., J. Mol. Biol. 67, 265 (1972)

44. Kahan, L., Kaltschmidt, E., Biochemistry 11, 2691 (1972)

45. Ginzburg, J., Zamir, A., J. Mol. Biol. 93, 465 (1975)

46. Moore, G., Crichton, R.R., Biochem. J. 143, 607 (1974)

47. Bakardjiva, A., Crichton, R.R., Biochem. J. 143, 599 (1974)

48. Thomas, G., Sweeny, R., Chang, L., Noller, H.F., J. Mol. Biol. 95, 91 (1975)

49. Pochon, F., Ekert, B., Perrin, M., Eur. J. Biochem. 43, 115 (1974)

50. Perrin, M., Pochon, F., Eur. J. Biochem. 57, 319 (1975)

51. Benkoo, K., Delihas, N., BBRC 60, 901 (1974)

52. Miller, R.V., Sypherd, P.S., J. Mol. Biol. 78, 539 (1973)

53. Noller, H.F., Chang, C., Thomas, G., Aldridge, J., J. Mol. Biol. 61, 669 (1971)

54. Johnson, P.M., Walker, J.O., Eur. J. Biochem. 38, 459 (1973)

55. Gavrilova, L.P., Spirin, A.S., FEBS Letters 39, 13 (1974)

56. Cronenberg, J.H., Erdmann, V.A., J. Mol. Biol. 95, 125 (1975)

57. Wan, K.K., Zahid, N.D., Baxter, R.M., Eur. J. Biochem. 58, 397 (1975)

58. Kahan, L., Held, W.A., Nomura, M., J. Mol. Biol. 88, 797 (1974)

59. Schechter, N., Elson, D., Spitnik-Elson, P., FEBS Letters 57, 149 (1975)

60. Huang, K.H., Cantor, C.R., J. Mol. Biol. 97, 423 (1975)

61. Huang, K.H., Fairclough, R.H., Cantor, C.R., J. Mol. Biol. 97, 443 (1975)

62. Matthaei, H., Amelunxen, F., Eckert, K., Heller, G., Ber. Bunsenges. Phys. Chem. 68, 737 (1964)

63. Kaji, H., Kaji, A., Proc. Nat. Acad. Sci. USA 52, 1541 (1964)

64. Nirenberg, M., Leder, P., Science 145, 1399 (1964)

65. Kurland, C.G., J. Mol. Biol. 18, 90 (1966)

66. Kim, S.H., Quigley, G., Suddath, F.L., McPherson, A., Sueden, D., Kim, J.J. Weinzierl, J., Blattmann, P., Rich, A., Proc. Nat. Acad. Sci. USA 69, 3746 (1973)

67. Pongs, O., Bald, R., Erdmann, V.A., Proc. Nat. Acad. Sci. USA 70, 2229 (1973)

68. Pongs, O., Bald, R., Wagner, T., Erdmann, V.A., FEBS Letters 35, 137 (1973)

69. Harris, J.R., Greenwell, P., Symons, R.H., BBRC 55, 117 (1973)

70. Sonenberg, N., Wilchek, M., Zamir, A., Proc. Nat. Acad. Sci. USA 70, 1423 (1973)

71. Pongs, O. Lanka, E., Proc. Nat. Acad. Sci. USA 72, 1505 (1975)

72. Pongs, O., Stöffler, G., Lanka, E., J. Mol. Biol. 99, 301 (1975)

73. Pongs, O., Rössner, E., Hoppe Seyler's Z. Physiol. Chem. 356, 1297 (1975)

74. Wagner, R., Gassen, H.G., BBRC 65, 519 (1975)

75. Fiser, J., Scheit, K.H., Stöffler, G., Kuechler, E., BBRC 60, 1112 (1974)

76. Fiser, J., Magaritella, P., Kuechler, E., FEBS Letters 52, 281 (1975)

77. Fiser, J., Scheit, K.H., Stöffler, G., Küchler, E., FEBS Letters 56, 226 (1975)

78. Sopori, M., Pellegrini, M., Lengyel, P., Cantor, C.R., Biochemistry 13, 5432 (1974)

79. Oen, H. Pellegrini, M., Eilat, D., Cantor, C.R., Proc. Nat. Acad. Sci. USA 70, 2799 (1973)

80. Hsiung, N., Reines, S.A., Cantor, C.R., J. Mol. Biol. 88, 841 (1974)

81. Pellegrini, M., Oen, H., Cantor, C.R., Proc. Nat. Acad. Sci. USA 69, 837 (1972)

82. Barta, A., Kuechler, E., Branlant, C., Widada, J.S., Krol, A., Ebel, J.P., FEBS Letters 56, 170 (1975)

83. Czernilofsky, A.P., Collatz, E.E., Stöffler, G., Kuechler, E., Proc. Nat. Acad. Sci. USA 71, 230 (1974)

84. Bispink, L., Matthaei, H., FEBS Letters 37, 291 (1973)

85. Schwartz, J., Gordon, E., Ofengand, J., Proc. Nat. Acad. Sci. USA 71, 3951 (1974)

86. Bispink, L., Dissertation (1976), Universität Göttingen

87. Sonenberg, N., Wilchek, M., Zamir, A., Proc. Nat. Acad. Sci. USA 72, 4332 (1975)

88. Noller, H.F., Chaires, J.B., Proc. Nat. Acad. Sci. USA 69, 3115 (1972)

89. Noller, H.F., Herr, W., J. Mol. Biol. 90, 181 (1974)

90. Delihas, N., Dunn, J.J., Erdmann, V.A., FEBS Letters 58, 76 (1975)

91. Barbacid, M., Vazques, D., J. Mol. Biol. 93, 449 (1975)

92. Litman, D.J., Lee, C.L., Cantor, C.R., FEBS Letters 47, 268 (1974)

93. Porter, R.R., Methods of Enzymology ed. by S.P. Colowick & N.O. Kaplan, New York Academic Press 4, 211 (1957)

94. von der Haar, F., Eur. J. Biochem., 34, 84 (1973)

95. Anderson, G.W., Zimmerman, J.E., Callahan, F.M., J. Am. Chem. Soc. 86, 1839 (1964)

96. Beilstein's Handbuch der Chemie 21, 380 (1935)

97. Lapidot, Y., de Groot, N., Rappaport, S., Hamburger, A.D., Biochem. Biophys. Acta 149, 532 (1967)

98. Sprinzl, M., von der Haar, F., Schlimme, E., Sternbach, H., Cramer, F., Eur. J. Biochem. 25, 262 (1972)

99. Gros, F., Matthaei, H., Practical Molecular Genetics, Springer Verlag im Druck

100. Hardy, S.J.S., Kurland, C.G., Voynow, P., Mora, G., Biochemistry 8, 2897 (1969)

101. Kaltschmidt, E., Wittmann, H.G., Anal. Biochem. 34, 401 (1970)

102. Matthaei, H., Voigt, H.P., Heller, G., Neth, R., Schöch, G., Kubler, H., Amelunxen, F., Sander, G., Parmeggiani, A., Cold Spring Harbor Symp. Quant. Biol. 31, 25 (1966)

103. Zahn, H., Angew. Chem. 67, 561 (1955)

104. Van Duin, J., Kurland, C.G., Molec. Gen. Genet. 109, 169 (1970)

105. Randall-Hazelbauer, L.L., Kurland, C.G., Molec. Gen. Genet. (1972)

106. Van Dieijen, G., Van der Laken, C.J., Van Knippenberg, P.H., Van Duin, J., J. Mol. Biol. 93, 351 (1975)

107. Schenkman, L.M., Ward, C.D., Moore, P.B., Biochem. Biophys. Acta 353, 503 (1974)

108. Rummel, D.P., Noller, H.F., Nature New Biol. 245, 72 (1973)

109. Delihas, N., Topol, E., Larrinnia, J., FEBS Letters 53, 170 (1975)

110. Brakier-Gingras, L., Provost, L., Dugas, H., Biochem. Biophys. Res. Commun. 60, 1238 (1974)

111. Richter, D., Erdmann, V.A., Sprinzl, M., Nature New Biology 246, 132 (1973)

112. Lelong, J.C., Gros, D., Gros, F., Bollen, A., Maschler, R., Stöffler, G., Proc. Nat. Acad. Sci. USA 71, 248 (1974)

113. Bermek, E., Matthaei, H., Hoppe-Seyler's Z. Physiol. Chem. 351, 1377 (1970)

114. Robertus, J.D., Ladner, J.E., Rhodes, D., Brown, R.S., Clark, B.F.C., Klug, A., Nature (London) 250, 546 (1974)

115. Cramer, F., Doepner, H., van der Haar, F., Schlimme, E., Seidel, H., Proc. Nat. Acad. Sci. USA 61, 1384 (1968)

116. Litt, M., Biochemistry 10, 2223 (1971)

117. Igo-Kemenes, T., Zachau, H.G., Eur. J. Biochem. 10, 549 (1969)

118. Igo-Kemenes, T., Zachau, H.G., Eur. J. Biochem. 18, 292 (1971)

119. Rhodes, D., J. Mol. Biol. 94, 449 (1975)

120. Robertus, J.D., Jane, E., Ladner, J.E., Rhodes, D., Brown, R.S., Clark, B.F.C., Klug, A., Nucleic Acids Research 1, 927 (1974)

121. Chang, S.E., Ish-Horowicz, D., J. Mol. Biol. 84, 375 (1974)

122. Saneyoshi, M., Nishimura, S., Biochem. Biophys. Acta 246, 123 (1971)

123. Yang, C.H., Söll, D., J. Biochem. 73, 1243 (1973)

124. Carbon, J., Methods of Enzymology ed. by K. Moldave & L. Grossman, Academic Press New York 20, 135 (1971)

125. Rao, Y., Cherayil, J.D., Biochem. J. 143, 285 (1974)

126. Cramer, F., Progress in Nucleic Acid Res. and Molecular Biology ed. by J.N. Davidson & W.E. Cohn, Academic Press New York 11, 391 (1971)

127. Brown, D.M., In Basic Principles in Nucleic Acid Chemistry ed. by. P.O.P. Tso, Academic Press New York, 2, 1 (1974)

128. Stocks, J., Bull. Soc. Chim. Belg. 70, 125 (1961)

129. Means, G.E., Feeney, R.E., Chemical Modification of Proteins,Holden-Day Inc. San Francisco (1971)

130. Straus, J.H., Kelly, R.B., Sinsheimer, R.L., Biopolymers 6, 793 (1968)

131. Ohashi, Z., Saneyoshi, M., Harada, F., Hara, H., Nishimura, S., Biochem. Biophys. Res. Commun. 40, 866 (1970)

132. Nishimura, S., Progress in Nucleic Acid Res. and Molecular Biology ed. by J.N. Davidson & W.E. Cohn, Academic Press New York 12, 49 (1972)

133. Ohashi, Z. Maeda, M. Closkey, J.A., Nishimura, S., Biochemistry 13, 2620 (1974)

134. Friedman, S., Li, H.J., Nakanishi, K., Van Lear, G., Biochemistry 13, 2932 (1974)

135. Chakraburtty, K., Steinschneider, A., Case, R.V., Mehler, H.A., Nucleic Acids Res. 2, 2069 (1975)

136. Barrell, B.G., Clark, B.F.C., Handbook of Nucleic Acid Sequences, Joynson Bruvvers Ltd., Oxford, England

137. Schoemaker, J.J.P., Schimmel, P.R., J. Mol. Biol. 84, 503 (1974)

138. Gassen, H.G., Leifer, W., Z. Anal. Chem. 252, 337 (1970)

139. Uziel, M.C., Koh, C., Cohn, W.E., Anal. Biochem. 25, 77 (1968)

140. Söll, D., Schimmel, P.R., Enzymes 10, 489 (1974)

141. Kisselev, L.L., Favorova, O.O., Adv. Enzymol. Relat. Areas Mol. Biol. 40, 141 (1974)

142. Dube, S.K., Nature New Biol. 243, 103 (1973)

143. Schulman, L.H., J. Mol. Biol. 58, 117 (1971)

144. Schulman, L.H., Proc. Nat. Acad. Sci. USA 66, 507 (1970)

145. Agris, P.F., Söll, D., Seno, T., Biochemistry 12, 4331 (1973)

146. Seno, T., Agris, P.F., Söll, D., Biochem. Biophys. Acta 349, 328 (1974)

L E B E N S L A U F

Am 13.12.1948 wurde ich, Friedrich Beesk, als drittes Kind des damaligen Volksschullehrers Reinhard Beesk und seiner Ehefrau Hildegard, geb. Seibt, in Angerstein, Kreis Göttingen geboren.

1955 - 1959	Grundschule
1959 - 1967	Neues Gymnasium zu Göttingen
1967 - 1968	Militärdienstzeit
WS 1968	Aufnahme des Chemiestudiums an der Georg-August-Universität zu Göttingen
WS 1971	Diplom-Chemiker-Vorprüfung
WS 72-SS 73	Diplomarbeit am Max-Planck-Institut für experimentelle Medizin, Göttingen
WS 1973	Diplom-Chemiker-Hauptprüfung
WS 73-WS 75	Anfertigung der vorliegenden Dissertation unter Leitung von Professor Dr. H. Matthaei